

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

De l'atrophie des ovules dans les ovaires des mammifères.

PAR LE DR N. MATCHINSKY.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Dans son récent travail : « L'état actuel de la question de l'atrophie sénile », publié en 1899 dans les *Archives russes de Pathologie*, M. le professeur Metchnikoff, d'après ses recherches, et celles d'autres savants, arrive à la conclusion suivante : l'atrophie physiologique aussi bien que l'atrophie pathologique sont la conséquence de la lutte perpétuelle entre les cellules normales des tissus d'une part et les macrophages de l'autre. Les éléments sains des tissus, afin de pouvoir soutenir cette lutte contre les macrophages, sécrètent continuellement des substances qui agissent sur ces derniers comme des poisons. Mais dès qu'une cellule perd, à la suite de quelque circonstance, la faculté de sécréter cette substance protectrice, immédiatement elle est assaillie par les phagocytes et dévorée. »

Quant à l'atrophie des vieillards proprement dite, Metchnikoff exprime l'idée que, malgré l'insuffisance et même quelques contradictions dans les résultats des recherches faites jusqu'à présent, on peut cependant supposer que ce n'est pas tant l'épuisement de la faculté reproductrice des cellules qui en constitue la base, mais que « l'atrophie sénile est la conséquence de la lutte entre les éléments des tissus, lutte qui avec l'âge devient de plus en plus violente » et qui se termine par le triomphe des macrophages, lesquels eux-mêmes se transforment en tissu conjonctif et envahissent les éléments nobles de l'orga-

nisme. Pourquoi donc cette lutte se termine-t-elle fatalement à l'avantage des macrophages ?

M. Metchnikoff l'explique par la différence de la force de résistance des différents tissus de l'organisme animal aux influences nocives. Ainsi, les ovules et les cellules nerveuses sont très sensibles, tandis que les phagocytes possèdent une grande force de résistance.

Et si l'on songe que l'organisme pendant la vie est traversé par un grand nombre de poisons sécrétés, soit par les microbes auxquels il sert d'habitat normal, soit par ceux venus de dehors, on comprendra facilement que, dans la lutte pour l'existence, ce sont les éléments les plus résistants, c'est-à-dire les phagocytes, qui prennent le dessus.

Sans doute, cette manière d'interpréter les divers processus atrophiques est fort attrayante ; elle l'est non seulement au point de vue purement théorique, mais aussi, ainsi que l'admet M. Metchnikoff, au point de vue pratique, en permettant d'entrevoir la possibilité d'intervenir dans le combat des cellules. Mais les faits de cet ordre, connus jusqu'à présent, sont fort peu nombreux et leur étude systématique s'impose forcément. C'est pourquoi M. Metchnikoff m'avait proposé de m'en occuper et de commencer par étudier l'atrophie des ovules dans les ovaires des mammifères.

Il avait attiré mon attention surtout sur cette dernière question, parce que l'atrophie des ovules débute de très bonne heure et se continue pendant toute la vie de l'animal. Cette atrophie apparaît donc à une époque de la vie où il ne peut être question de troubles de la nutrition consécutifs à l'artério-sclérose. En un mot, le processus d'atrophie des ovules est le moins compliqué de toutes les atrophies.

Il nous semble inutile d'exposer l'historique complet de la question et de mentionner toutes les opinions sur ce point, car ceux qui s'intéressent particulièrement à ces études pourront trouver les indications nécessaires dans les importants travaux de *Flemming*¹ et *Schottländer*².

Je citerai seulement un court résumé des travaux où il est

1. Ueber die Bildung von Richtungsfiguren in Sanguethiereiern beim Untergang Graafscher Follikel. (*Arch. für Anatomie und Entwicklungsgesch.*, 1883).

2. Ueber den Graafschen Follikel, sein Schicksal bei Mensch- und Sanguethiereiern. (*Arch. für mikr. Anatomie*, Bd. 41, 1893.)

question directement ou indirectement des phénomènes phagocytaires dans l'atrophie des ovules.

D'après les recherches de *Brünn*¹, *Strahl*², *Ruge*³, *Henneguy*⁴ et *Mingazzini*⁵, l'atrophie des ovules chez les oiseaux, les amphibiens et les reptiles consiste en ce que le vitellus subit une segmentation irrégulière, et en même temps la couche de l'épithélium folliculaire s'épaissit, les cellules épithéliales pénètrent avec les leucocytes dans le jaune d'œuf, l'absorbent et se transforment ensuite en tissu conjonctif qui se substitue au follicule.

D'après *Mingazzini*, le vitellus peut être sujet à un autre genre de transformation, et notamment, il peut quelquefois tout simplement se liquéfier. Il faut en outre remarquer, et *Henneguy* insiste tout particulièrement sur ce point, que chez les animaux sus-mentionnés les phagocytes pénètrent dans le jaune d'œuf dès le début de l'atrophie; ils séparent les débris du jaune fragmenté, les dévorent et les digèrent.

Quant à l'atrophie des ovules dans les ovaires des mammifères, il existe plusieurs travaux importants, ainsi que ceux de *Schottländer* (l. c.), *Flemming* (l. c.), *Janosik*⁶, *Paladino*⁷, *Henneguy* (l. c.) et d'autres.

D'après ces auteurs, la forme la plus fréquente de la dégénérescence des ovules est la fragmentation. Pendant ce phénomène, on observe dans l'ovule à peu près les mêmes changements que pendant son développement normal après la fécondation. Il n'y a qu'une différence: pendant le processus atrophiique le vitellus se divise en segments non réguliers, et même cette segmentation cesse bientôt. *Henneguy* appelle ce genre d'atrophie « le développement parthénogénétique ». D'après lui il se produit ici les mêmes phénomènes que chez certaines plantes et

1. Die Rückbildung nichtausgestossener Eierstockeier bei den Vögeln. (*Beitr. z. Anat. und Embryologie als Festgabe...* Bonn, 1882.)

2. Die Rückbildung reifer Eierstockeier am ovarium von *Lacerta agilis* (*Verhandl. die Anat. Ges.*, auf VI, vers. 1892.)

3. Vorgänge am Eifollikel der Wirbelthiere. (*Morphol. Jahrbüch*, Bd. 15, 1889.)

4. Recherches sur l'atrézie des follicules de Graaf. (*Journal de l'Anatomie et de la Physiologie*, 1994.)

5. Corpi lutei veri e falsi dei Rettili. (*Ricerche fatte nel Labor. di Anat. normale di R. Università di Roma*, t. III, 1893.)

6. Die Atrophie der Follikel und ein seltsames Verhalten der Eizellen. (*Arch. f. mikr. Anat.* Bd. 48, 1896.)

7. Ulteriori ricerche sulla distruzione e rinnovamento continui del paenichima ovarico dei Mammiferi, Napoli, 1887.

certains animaux, chez lesquels la maturité est hâtée par l'insuffisance de la nutrition, c'est-à-dire que l'œuf mûrit prématûrement, et, après avoir exécuté les premières phases de la segmentation, périt.

Outre ce genre de dégénérescence, on en a décrit aussi d'autres, par exemple, la dégénérescence albuminoïde, graisseuse, hyaline, ainsi que les formes mixtes.

L'épithélium folliculaire est sujet aussi à toutes sortes de dégénérescences (chromatolyse, dégénérescence graisseuse, hyaline, etc.). Quant au point où commence la dégénérescence, on n'est pas d'accord. Pendant que *Henneguy* suppose que l'épithélium folliculaire sert d'aliment à l'œuf, et que c'est seulement après la dégénérescence de l'épithélium que survient celle de l'œuf, *Schottländer*¹ dit au contraire que « *der Zustand des Follikelepithels ist nur bedingt verwerthbar* », et que l'épithélium peut conserver son état normal alors même que l'œuf présente des traces évidentes d'atrophie.

Le fait que l'œuf qui s'atrophie n'est pas simplement résorbé, mais qu'il est détruit par les cellules avoisinantes, — ce fait est connu depuis longtemps. *Pflüger*² avait déjà remarqué que les cellules de la couche granuleuse (Nagelzellen) envoient des prolongements dans l'intérieur de l'œuf, qu'ensuite le vitellus se détache de la zone *pellucide*, se liquéfie dans certaines parties, et se désagrège dans d'autres.

Cette remarque de *Pflüger* a été ensuite confirmée et complétée par plusieurs observateurs (*H. Virchow*³, *Nagel*⁴, *Pettipierre*⁵). Quelques-uns, comme par exemple *Janosik*, *Schottländer* et *Henneguy*, supposent que les cellules migratrices qui dérivent de la couche granuleuse peuvent aussi prendre part à la destruction des restes de l'œuf désorganisé. Cette transformation des cellules de la couche granuleuse en leucocytes a été déjà observée par *Schulin*⁶. Des travaux que nous venons de citer il résulte que chez les mammifères, à l'encontre de ce que l'on

1. Beitrag zur Kenntniss der Follikelatresie. (*Arch. für mikr. Anatomie*. Bd. 37, 1891.)

2. Ueber die Eierstöcke der Säugetiere und des Menschen. Leipzig, 1863.

3. Durchtreten von Granulosazellen durch die Zona pellucida des Säugethiereies. (*Arch für mikr. Anat.*, Bd. 24, 1887.)

4. Das Menschliche Ei. (*Arch. f. mikr. Anat.*, Bd. 81.)

5. Ueber die Eindringung von Granulosazellen durch die Zona pellucida den menschl. Eiern, Bd. 35.)

6. Zur morphologie des Ovariums. (*Arch. f. mikr. Anat.*, Bd. 19, 1881.)

observe chez d'autres vertébrés, les phénomènes de la phagocytose deviennent évidents seulement à la période plus avancée de l'atrophie de l'œuf, et les cellules de la couche granuleuse, de même que les leucocytes, détruisent seulement les restes de l'œuf déjà désorganisé ; *Henneguy* dit même : « Très souvent l'ovule s'atrophie sans que les éléments cellulaires prennent part au processus de régression. »

Le but de mon travail ne consiste pas à démontrer l'existence des phénomènes phagocytaires, qui sont déjà un fait avéré, mais j'ai cherché : 1^o à voir si vraiment l'atrophie des ovules des mammifères se distingue notablement de ce même processus chez d'autres vertébrés ; 2^o j'ai voulu, en outre, approfondir davantage l'étude de la manifestation de la phagocytose dans ces cas particuliers, c'est-à-dire voir de quelle façon ces phagocytes dévorent les éléments de l'œuf.

II

Je me suis servi pour mes recherches des ovaires des animaux habituels aux laboratoires, c'est-à-dire des cobayes, des lapins, des chiens et des chats¹. Les morceaux d'organes d'un animal, qui venait d'être sacrifié, ou bien l'organe tout entier étaient plongés pendant 24 heures dans la liqueur forte de Flemming ; ensuite je les mettais dans la paraffine, et j'en faisais des séries de coupes. Il est indispensable, afin de bien étudier l'ovule et le follicule, de faire une série de coupes dans tous les plans de l'organe. Pour colorer les préparations, je les laissais pendant 24 heures dans une solution aqueuse de safranine saturée, et ensuite je les lavais dans l'alcool acidulé, ou bien je les traitais par l'acide picrique et par l'alcool. Je trouve que ce procédé de préparation convient le mieux à l'étude des processus d'atrophie : il permet de bien distinguer les éléments de la dégénérescence de ceux qui sont sains.

Quelquefois, au lieu de me servir de la liqueur de Flemming,

1. En outre j'ai eu l'occasion d'examiner deux ovaires d'une femme qui lui ont été enlevés à la suite d'une opération. J'avais examiné aussi les ovaires des poules, des grenouilles et des tritons. Mais ces études n'étant pas terminées, je les laisse de côté.

je faisais les préparations avec celle de *Hermann*, ou bien les préparations fixées par la liqueur de *Flemming* étaient colorées avec de l'éosine additionnée de bleu de méthylène, ou bien encore avec de la safranine et du picro-carmin d'indigo. Mais tous ces procédés ne valent pas le premier.

Les ovules atrophiés sont déjà assez nombreux dans les ovaires mêmes des femelles toutes jeunes, mais pubères; on peut donc étudier le processus d'atrophie sur les ovaires de tout animal sain. Cependant, il est plus avantageux de faire ces études sur les ovaires des animaux placés dans quelque condition anormale, ou même sur les ovaires des animaux malades, et cela parce que : 1^o nous pouvons trouver, chez ces animaux, un très grand nombre d'ovules atrophiés, et dans les différentes phases de l'atrophie, et 2^o parce que cette atrophie pathologique, ainsi que j'ai pu le constater pendant les comparaisons que j'ai faites des follicules des animaux sains et malades, ne diffère en rien de l'atrophie physiologique.

Tout le monde sait que souvent les animaux en captivité ne se reproduisent pas; cela résulte de l'atrophie d'un grand nombre d'ovules, ainsi que l'avait démontré *Mingazzini*. On peut en déduire que les ovules sont extrêmement sensibles à toute influence nocive pour l'organisme entier. *Mingazzini* avait trouvé, dans les ovaires des reptiles vivant en captivité, un nombre beaucoup plus considérable de follicules atrophiés, que dans les ovaires des mêmes animaux en liberté, et dans les mêmes saisons. M. *Metchnikoff* donna l'explication de ces faits par ses études sur les poules, auxquelles il avait préalablement injecté de la toxine du tétanos.

A l'examen des différents organes de ces poules, il constata que, tandis que la quantité de toxine qui y est renfermée est en rapport avec la quantité de sang qui s'y trouvait, les testicules des mâles et les ovaires de femelles en renfermaient, au contraire, une dose si forte que l'injection faite aux souris de l'émulsion préparée avec ces organes produisait un tétanos mortel. Et ceci permet de supposer *a priori* que les autres toxines doivent agir à l'instar de la toxine tétanique.

Par conséquent, si l'on injecte aux animaux des bactéries qui sécrètent ces toxines, ou bien si l'infection se produit naturellement, le résultat au point de vue qui nous intéresse doit être

le même. Et si nous trouvons une certaine quantité d'ovules atrophiés dans les ovaires mêmes des animaux sains, cette atrophie doit provenir aussi de l'intoxication par les toxines sécrétées par des bactéries peu nombreuses qui ont fortuitement pénétré dans l'organisme. Ces toxines, ayant été en petite dose, ne provoquent pas de troubles généraux, mais peuvent cependant, en s'accumulant dans les ovaires, détruire un bon nombre d'ovules. En effet, ce que nous trouvons dans les préparations histologiques des ovaires est parfaitement confirmé par les expériences susmentionnées de M. Metchnikoff. Même à la suite de l'injection hypodermique aux animaux de microorganismes sécrétant seulement des toxines faibles, par exemple de la levure pathogène¹ (Blastomyces de Curtis), on peut déjà observer de notables modifications dans les ovaires. Ces modifications consistent dans l'atrophie d'un grand nombre d'ovules.

J'ai trouvé des modifications beaucoup plus considérables dans les ovaires des cobayes auxquels on avait fait l'injection de toxine diphtérique. L'animal recevait une seule injection non mortelle (1/300, 1/200 de c. c.). Il était sacrifié du 2^e au 5^e jour après l'injection, et, à l'examen, je trouvai déjà presque la moitié des ovules dans différentes phases de dégénérescence, avec prédominance de celle du début.

Quant aux phénomènes que l'on observe, au point de vue dont nous nous occupons, à la suite d'une intoxication chronique, je n'en ai eu malheureusement qu'un seul cas. J'ai pu examiner les ovaires d'une femelle de cobaye morte un mois après une double injection de toxine diphtérique de 1/300 et 1/150 c. c. Elle a eu de la paralysie des extrémités. Les ovaires étaient très atrophiés : ils étaient presque de moitié plus petits qu'à l'état normal. A l'examen microscopique, j'ai pu trouver dans chacun des ovaires à peine trois à quatre ovules sains.

La toxine tétanique produit, il me semble, les mêmes effets que la toxine diphtérique. J'en juge d'après l'examen des ovaires d'un cobaye auquel on avait injecté une dose mortelle, et qui a été tué trois jours après l'injection.

1. J'ai examiné les ovaires de deux cobayes et d'une poule, auxquels M. le Dr Vlaeff, pour ses expériences personnelles, avait fait ce genre d'injections. Grâce à l'amabilité de ce confrère, j'ai eu aussi à ma disposition les ovaires des animaux auxquels on avait fait l'ablation de la rate. Je parlerai plus loin du résultat de mes observations.

Les effets des poisons inorganiques sont les mêmes que ceux des toxines. Je m'en suis convaincu en examinant les ovaires d'un cobaye et d'une lapine empoisonnées avec de l'arsenic. J'ai trouvé dans les ovaires de ces animaux presque les mêmes lésions que dans l'intoxication avec une dose non mortelle de toxine diphtérique.

L'atrophie des ovules peut être provoquée non seulement par les différentes intoxications, mais aussi par tout trouble organique favorisant la pénétration de substances toxiques dans la circulation générale.

A l'appui de cette thèse, je peux citer les observations faites sur les ovaires des animaux privés de leur rate.

J'ai eu à ma disposition les ovaires d'une jeune chienne tuée 6 mois après l'ablation de la rate, ainsi que les ovaires d'une chatte de 3 mois et demi, sacrifiée 2 mois après l'opération.

A l'autopsie, on avait constaté, chez les deux animaux, de grands changements dans le foie, les ganglions lymphatiques, la glande thyroïde, etc.

Quant aux ovaires des deux animaux, on y trouvait une intense atrophie des ovules. Ce qui fait supposer que les animaux privés de leur rate sont privés en même temps du filtre qui, à l'état normal, s'empare des bactéries et des toxines; c'est pourquoi les toxines circulent librement dans le sang, s'accumulent dans les ovaires, et par conséquent dans les ovules.

III

Je passe maintenant à la description des phénomènes observés dans les ovules pendant l'évolution atrophique.

Je dois dire tout d'abord que, même chez les mammifères, il n'y a pas de règle générale pour la dégénérescence. Chaque ovule ne périra pas à sa façon, mais il existe néanmoins certaines particularités, selon l'espèce de l'animal, l'âge de l'œuf, et sans doute, selon d'autres circonstances qui sont difficiles à percevoir. Cela a été constaté aussi par d'autres observateurs, notamment par Schottländer, qui attribue précisément à ce fait la divergence des savants sur les phénomènes de l'atrophie des

ovules. Henneguy dit que sur la même coupe on peut observer les différentes formes de la dégénérescence, et il ajoute que « différents processus dégénératifs peuvent se montrer associés dans un même ovule et dans un même follicule ».

Je commencerai par décrire ce qui se passe dans l'atrophie des ovules de chienne, car 1^o chez cet animal, on peut suivre toute la marche du processus de régression, et 2^o les phénomènes phagocytaires se manifestent ici d'une façon très évidente. Ce qui contribue à faciliter l'étude de cette dégénérescence, c'est que les ovules des chiennes subissent de préférence la dégénérescence graisseuse.

La graisse, comme on le sait, est très bien colorée en noir par l'acide osmique. Par conséquent, lorsque les cellules avoisinant l'ovule absorberont ses débris transformés en graisse, on verra très bien, à l'intérieur de ces cellules, des gouttelettes noires colorées par l'acide osmique. Si nous examinons à l'état normal le follicule et son ovule arrivés à cette période du développement où la cavité de l'ovisac est déjà remplie de liquide folliculaire, nous verrons que le vitellus est parfaitement transparent ou à peine granuleux, que la vésicule germinatrice a la forme globulaire, et renferme un réseau chromatique très visible; les cellules de la couche granuleuse sont régulièrement cylindriques ou bien piriformes, avec des prolongements dirigés vers la zone pellucide; quelques-unes de ces cellules sont déjà à l'état de segmentation. A cette période, ni dans l'ovule, ni dans les cellules de la couche granuleuse, ni dans l'épithélium folliculaire, il n'est possible de déceler la présence de graisse. Mais, dès que l'ovule commence à dégénérer, immédiatement on voit s'accumuler dans le vitellus des gouttelettes de graisse dont la quantité s'accroît si rapidement que, même à une époque très peu avancée, quand le vitellus a conservé encore tous ses contours, il est déjà tout noir, car les gouttelettes graisseuses isolées se sont fusionnées.

Les parois de la vésicule germinative dès la première phase s'affaissent, et il est impossible de suivre le sort ultérieur de la vésicule, parce qu'elle devient complètement invisible au milieu de la masse de graisse. La zone pellucide, qui avait au début l'aspect homogène ou bien légèrement filamenteux, paraît à la fin être percée de pores. Quant aux cellules de la couche granuleuse,

elles présentent dès le commencement de la dégénérescence les phénomènes suivants : pendant que certaines d'entre elles restent normales, d'autres se gonflent, s'arrondissent et se remplissent de petites gouttelettes de graisse (fig. 1, pl. II). Sur les coupes réussies, on peut voir que ce sont précisément ces dernières cellules qui pénètrent par leurs fins prolongements jusqu'à l'ovule (fig. 2), et parfois on peut même apercevoir qu'une telle cellule avait pratiqué de larges perforations dans l'enveloppe de l'ovule. Dans ces cas, une partie du protoplasma se trouve plongée dans le vitellus, tandis que l'autre reste dehors. Même ce tableau montre déjà suffisamment que les cellules de la couche granuleuse ont ici pour fonction de dévorer l'ovule dégénéré. En outre, à mesure que le processus s'avance, le nombre des cellules de la couche granuleuse autour de l'ovule diminue de plus en plus. Mais en revanche, dans le liquide folliculaire et dans le tissu environnant le follicule, nous voyons un grand nombre de cellules de différentes grosseurs remplies de graisse.

Les unes par leur aspect extérieur ressemblent aux leucocytes mononucléaires, tandis que d'autres rappellent les cellules de la couche granuleuse ; on rencontre aussi des formes intermédiaires. Il n'est pas douteux que toutes ces cellules, ou au moins le plus grand nombre sont celles de la couche granuleuse.

Après s'être repues de graisse, elles s'en vont ; quelques-unes pénètrent peut-être dans les vaisseaux lymphatiques, d'autres restent sur place et se transforment en cellules fusiformes.

Lorsque l'ovule, en train d'être dévoré par les phagocytes, diminue, il se détache de son enveloppe qui, dans la plupart des cas, s'affaisse aussi.

Dans cet état de la membrane, il devient incommodé aux dernières cellules de la couche granuleuse, et peut-être aussi aux leucocytes¹ arrivés du dehors, de se procurer de la graisse de la même façon que les premières cellules ; c'est pourquoi elles pénètrent tout simplement à travers la zone pellucide dans l'intérieur de l'ovule (fig. 3), l'absorbent et finissent par dévorer la membrane vitelline elle-même. Après avoir terminé leur tâche, ces cellules restent sur place, deviennent fusiformes

1. Je dois ajouter que toutes ces cellules ressemblant aux leucocytes sont mononucléaires, ce qui est tout naturel, car ce sont seulement les leucocytes mononucléaires qui prennent part à la destruction des tissus.

et comblient le vide qui s'était formé après la destruction du follicule. Quelquefois les phagocytes commencent à se transformer en cellules fusiformes avant la désorganisation complète de l'ovule; ainsi j'ai pu voir à l'intérieur de l'ovule, à côté de grandes cellules rondes remplies de graisse, des cellules fusiformes. D'autres fois il m'était arrivé de voir le contraire, c'est-à-dire, la zone pellucide restée intacte, mais aussi ni à l'intérieur ni au dehors on ne voit de phagocytes; dans ces cas il paraîtrait que le travail est resté inachevé faute de travailleurs.

Sur les ovaires des chiennes, je n'ai pas pu remarquer si le changement de l'épithélium folliculaire précède les phénomènes de régression de l'ovule; il semble qu'ici le processus dans l'épithélium commence simultanément avec celui de l'ovule lui-même. Il consiste en ce que les cellules s'écartent les unes des autres, émettent des prolongements par lesquels elles s'anastomosent, et forment ainsi un réseau irrégulier, comme une sorte de plasmode.

Le nombre de cellules de ce réseau diminue progressivement, de sorte que, dans les follicules à la période avancée de l'atrophie, on ne voit plus de cellules épithéliales. Que deviennent-elles? Périssent-elles aussi, ou bien se transforment-elles peu à peu en phagocytes et prennent-elles part aussi à la démolition de l'ovule? Il m'est impossible de résoudre ces questions d'après les préparations que j'avais à ma disposition.

Ce que nous venons de décrire concerne l'atrophie des ovules adultes, mais cette même évolution se rencontre aussi chez les ovules et les follicules de tout âge: partout et toujours l'atrophie s'exprime par la dégénérescence graisseuse, et on voit autour des follicules dégénérés l'accumulation des cellules remplies de graisse.

Chez les chattes, l'atrophie des ovules s'effectue un peu autrement que chez les chiennes, et les phénomènes phagocytaires secondaires se manifestent ici avec beaucoup moins de netteté. Dans la plupart des cas, cependant, c'est aussi la dégénérescence¹ du vitellus et l'affaissement de la vésicule germinative qui ont lieu. Quelquefois le vitellus se fragmente irrégulièrement, mais ces phénomènes ne sont pas précédés de figures de

1. La graisse ici se distingue probablement par quelque particularité, car elle ne dépose pas sous forme habituelle de petits granules sphériques, mais on en voit sous forme de masses irrégulières, ayant l'aspect du charbon finement pulvérisé.

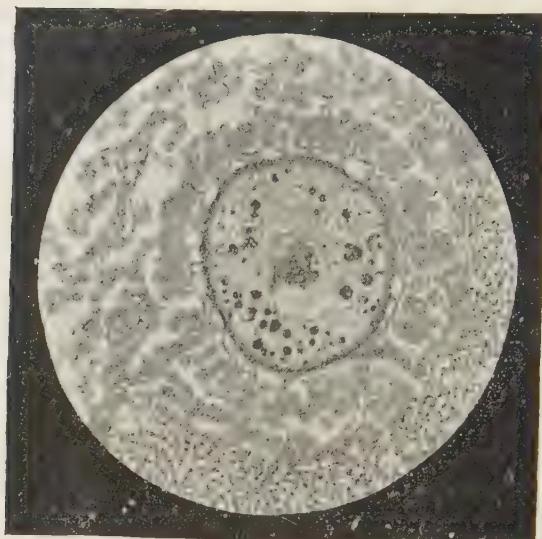


Fig. 8.



Fig. 9.

La phase du début et celle de la fin de la dégénérescence graisseuse de l'ovule de chatte, avec formation autour de lui d'une plasmodie par les cellules de la couche granuleuse et de l'épithélium folliculaire. Fixation par le liquide de Flemming, coloration par la safranine.

segmentation, ni de l'apparition du corpuscule polaire autour duquel se concentre le processus, ainsi que cela se voit chez les cobayes.

Parallèlement à l'atrophie de l'ovule se produisent aussi des modifications dans la couche granuleuse et dans l'épithélium folliculaire. Ces modifications consistent en une mobilisation des cellules, leur écartement les unes des autres, ce qui amène leur disposition irrégulière (fig. 8); on observe en même temps l'émission de prolongement, leurs anastomoses, et la formation d'un réseau plasmodique (fig. 9.)

Plus tard, l'ovule, sans perdre sa membrane, se ratatine à



Fig. 10.

Coupe d'ovaire d'une cobaye empoisonnée par la toxine diphtérique. Ovule jeune en état de segmentation assez régulière, coloration par la safranine.

la suite de la diminution du vitellus, et les mailles du réseau susmentionné se rétrécissent de plus en plus autour de l'ovule, et en même temps les noyaux des cellules perdent leur chromatine.

Pendant quelque temps, il ne reste du follicule que la zone pellucide, et c'est à cette époque seulement qu'on peut voir en dedans et en dehors de cette membrane quelques cellules rem-

plies de graisse et qui ressemblent aux leucocytes. De quelle façon s'effectue donc ici l'absorption de l'ovule?

Je n'ai pas pu suivre les détails de ce processus, mais il semblerait que l'absorption se fait avec le concours du plasmode dont nous avons parlé plus haut, et qui se forme des cellules de

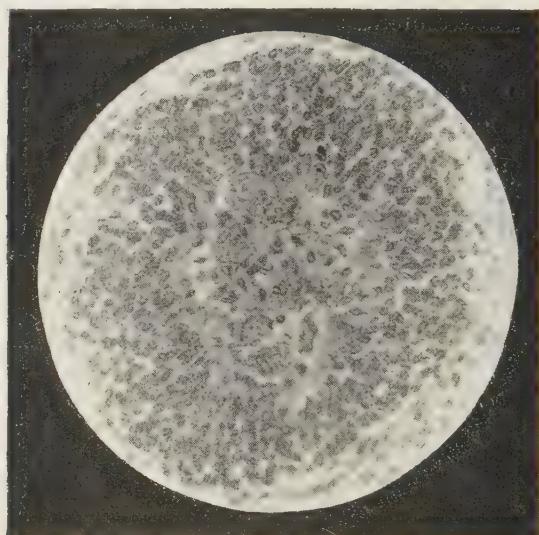


Fig. 11.

Une autre coupe du même ovaire. Débris d'ovule sous forme de sphères irrégulières restées non dévorées par les phagocytes au milieu d'un tissu conjonctif organisé.

la couche granuleuse et de l'épithélium folliculaire. Les follicules pendant le processus de l'atrophie sont entourés de grands amas de cellules renfermant des gouttelettes de graisse, et qui ressemblent à celles des corps jaunes (corpus lutei). On peut voir de semblables cellules aussi dans le follicule même, et dans le voisinage immédiat de l'ovule qui s'atrophie.

Chez les femelles de cobayes (fig. 10 et 11), de rats et de lapins, on observe le plus souvent deux genres d'atrophie selon l'âge de l'ovule. Dans les ovules jeunes les choses se passent de la façon suivante : le vitellus devient trouble, se divise en petites masses irrégulières, diminue de volume, comme s'il fondait, de sorte que la zone pellucide se plisse et enfin reste seule, ayant l'aspect d'un sac plié en deux. Souvent on voit dans ce petit sac et tout

autour des cellules remplies de granules graisseux. Ces cellules ressemblent aux leucocytes. Probablement ces cellules s'occupent de la destruction des débris de l'ovule, et se transforment ensuite en cellules fusiformes qui remplissent l'espace laissé par l'ovule détruit.

A mesure que l'atrophie de l'ovule s'avance, le nombre de cellules épithéliales qui l'entourent diminue, et puisqu'on constate dans le voisinage une quantité considérable de cellules rappelant par leur aspect les leucocytes mononucléaires, nous sommes autorisés à supposer qu'il se produit ici le même processus que celui de l'atrophie des ovules chez les chiennes, c'est-à-dire que les cellules épithéliales dévorent le vitellus et puis s'en vont.

Dans les ovules à la période voisine de la maturation, on observe le plus souvent une fragmentation préalable. Je ne décris pas le mode d'après lequel cette fragmentation a lieu, fragmentation qui est la manifestation de la maturité prématuée, car ce phénomène est décrit avec tous ses détails par Flemming, Janosik et Henneguy.

A l'époque où l'ovule se divise en fragments, la couche granuleuse est divisée, soit en cellules isolées, soit en amas de cellules réunies entre elles, et tout à fait semblables aux cellules géantes. On trouve aussi des mononucléaires isolés en quantité variable, et provenant probablement de la couche granuleuse.

Il n'est pas douteux, et cela a été confirmé par d'autres observateurs, que tous ces éléments prennent une part plus ou moins active à la destruction de débris de l'œuf. On peut même très bien suivre ce processus destructif.

Ainsi que représente la fig. 7, cela se passe précisément de la même façon qu'avait décrit M. Metchnikoff¹ en relatant le mode d'après lequel les leucocytes dévorent les globules rouges du sang, lorsqu'on injecte du sang d'oie dans la cavité péritonéale d'un cobaye : un phagocyte s'accroche à un fragment et le dévore peu à peu en commençant par sa surface extérieure. Pendant que la destruction de l'ovule s'effectue, la cavité folliculaire, à la suite de l'absorption du liquide, et grâce à l'élasticité des parties environnantes, s'affaisse de plus en plus, de sorte qu'il

ne reste à la fin du processus qu'un petit vide qui est comblé aussi par les phagocytes¹.

La fragmentation n'est pas le seul mode d'atrophie des ovules adultes ; ils peuvent s'atrophier de la même façon que les jeunes ovules ; ces derniers, d'autre part, peuvent aussi se fragmenter préalablement avant de subir des modifications ultérieures.

IV

Au commencement de cet article j'ai cité l'opinion de M. Metchnikoff sur la cause pour laquelle les ovules s'atrophient même chez des animaux sains : d'après lui, les ovules absorbent sans choix les matériaux nutritifs et avec eux les substances toxiques qui avaient pénétré accidentellement dans l'organisme. Ces substances toxiques rendent les ovules malades : ils perdent la faculté de sécréter la substance protectrice contre les macrophages. Cette opinion n'explique pas, cependant, pourquoi seulement un certain nombre d'ovules s'atrophie à la fois.

J'ai dit plus haut que, même chez un animal empoisonné par des toxines injectées, on trouve toujours une certaine quantité d'ovules sains.

D'autre part on sait que l'atrophie frappe les ovules de tout âge. La substance toxique diluée dans les liquides de l'organisme arrive à tous les ovules en même quantité : les conditions de la résistance étant les mêmes, il faut donc chercher la cause de la destruction d'un nombre limité d'ovules dans les processus vitaux des cellules elles-mêmes, et notamment dans l'exercice des fonctions digestives. D'ailleurs, Metchnikoff relate le fait suivant (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, p. 755) : si l'on injecte dans la cavité péritonéale d'un cobaye une trop grande quantité de sang d'oie, une partie seulement des globules rouges est dévorée par les phagocytes, et le reste demeure assez long-temps intact. Évidemment les phagocytes qui se trouvaient dans la cavité péritonéale dévorèrent autant de globules rouges qu'ils purent, et, comme leur digestion se fait assez lentement, ils dédaignèrent le reste.

1. Des fois, bien que rarement, on peut voir les débris de l'œuf au milieu du tissu conjonctif déjà organisé (fig. 41). Cela fait supposer que la phagocytose, à la suite de quelque circonstance, n'a pas été suffisante.

Rappelons-nous maintenant ce qui se passe pendant les premières phases de l'atrophie des ovules chez les chiennes : il n'y a qu'un certain nombre de cellules de la couche granuleuse qui soient remplies de granules graisseux ; d'autres en sont dépourvues. Cela prouve que les cellules ne sont pas occupées toutes à la fois à dévorer l'ovule, et que c'est seulement celles qui en ont besoin qui prennent part au repas. En se servant maintenant de ces faits pour comprendre pourquoi un nombre d'ovules relativement restreint s'atrophie à la fois, nous pouvons admettre qu'au moment où les substances toxiques circulaient à travers l'organisme, il n'y avait que ce certain nombre d'ovules qui éprouvait le besoin d'absorber des aliments, et qu'avec ces dernières il absorbait aussi les substances toxiques. Dans l'organisme sain, ces substances sont en petite quantité et elles séjournent peu de temps : aussi voit-on peu d'ovules s'atrophier à la fois.

Cela ne nous explique pas, cependant, pourquoi ce sont précisément les ovules qui sont le plus sensibles aux poisons. Malgré que ce fait a une grande importance pour l'organisme et qu'il est inévitable, nous pouvons le déduire de cet autre fait : la nature a doté chaque ovaire d'une énorme quantité d'ovules, au lieu de rendre ces derniers plus résistants.

CONCLUSIONS

1) L'atrophie des ovules chez les animaux sains, et qu'on pourrait appeler « atrophie physiologique », ne diffère en rien de celle qui est provoquée artificiellement par l'injection de toxines ou d'autres poisons. La différence n'existe que dans le nombre des ovules atrophiés.

2) L'atrophie de l'ovule est le plus souvent précédée de modifications des cellules de la granuleuse, qui changent leur position ordinaire, se mobilisent et se transforment en un réseau plasmodique. Ce processus doit être envisagé comme un phénomène de phagocytose primaire dans lequel l'ovule, probablement atteint par quelque intoxication, est attaqué à la fois par toute la masse des cellules de la granuleuse. Cette formation de plasmode est non seulement l'acte le plus précoce dans l'atrophie de l'ovule, mais aussi un phénomène qui s'observe chez tous les mammifères que j'ai pu étudier.

3) Les modifications visibles de l'ovule même présentent, au contraire, beaucoup de variations dans la série des mammifères. Tandis que chez les uns l'ovule se fragmente en plusieurs segments, chez d'autres il reste uni. La dégénérescence graisseuse présente un autre phénomène limité à quelques espèces seulement. On n'a pas le droit, par conséquent, de lui attribuer une importance fondamentale.

4) L'ovule fragmenté ou simplement dégénéré est ensuite en totalité ou, le plus souvent, en partie dévoré par des mononucléaires, provenant du plasmodium de la granuleuse. Cet acte constitue la phagocytose secondaire, qui présente une variabilité plus ou moins grande, suivant les cas.

5) La cause d'après laquelle les substances toxiques n'agissent pas en même temps sur tous les ovules de l'ovaire réside dans les propriétés vitales des ovules.

6) En résumant l'histoire de l'atrophie de l'ovule des mammifères, on peut se la représenter comme un processus cellulaire consistant dans l'affaiblissement de l'ovule et dans l'agression des cellules de la granuleuse qui enveloppent l'ovule par leur plasmodium, pénètrent à travers de la zone pellucide, et s'incorporent l'œuf ou ses débris. Finalement les macrophages de la granuleuse se transforment en tissu conjonctif qui remplit le follicule.

En terminant mon travail, je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à M. Metchnikoff qui a bien voulu me guider dans mes recherches.

EXPLICATION DES PLANCHES II ET III

Fig. 1. — Ovaire d'une chienne à laquelle on avait fait l'ablation de la rate. Ovisac avec son ovule à l'état de la dégénérescence graisseuse. Quelques cellules de la couche granuleuse renferment des granules graisseux. Dans le liquide folliculaire, entre les cellules de l'épithélium transformé et dans le tissu conjonctif environnant (*theca folliculi*), on voit des cellules renfermant des gouttelettes de graisse; ce sont les formes intermédiaires entre les cellules de la couche granuleuse et les leucocytes.

Fig. 2. — Coupe d'ovaire d'une chienne à laquelle on avait fait l'ablation

de la rate, une partie d'ovule à l'état de la dégénérescence graisseuse. Quelques cellules de la couche granuleuse pénètrent par leurs fins prolongements à travers la zone pellucide jusqu'au vitellus.

Fig. 3. — Coupe d'ovaire d'une chienne à laquelle on avait fait l'ablation de la rate. Une des phases avancées de la dégénérescence. Un certain nombre de cellules de la couche granuleuse a traversé la zone pellucide et se trouve à l'intérieur de l'ovule; ces cellules sont remplies de graisse; d'autres cellules de la couche granuleuse sont autour de l'ovule désorganisé, et ce sont soit des cellules renfermant la graisse et ressemblant aux leucocytes, soit des cellules fusiformes remplies aussi de graisse.

Fig. 4. — Coupe d'ovaire d'une lapine empoisonnée avec de l'arsenic. Ovule normal, à la période proche de sa maturité. Disposition régulière des cellules de la couche granuleuse; quelques-unes sont à la période de segmentation.

Fig. 5. — Une autre place de la même coupe. Ovule à la première phase de la dégénérescence. On voit dans l'ovule le fuseau dirigeant; les cellules de la couche granuleuse ne sont plus disposées régulièrement, leurs contours en sont effacés; les noyaux par suite de la dissolution de la chromatine sont pâles.

Fig. 6. — Coupe d'ovaire d'une cobaye tuée après l'injection de levure (*Blastomyces Curtiss*). Ovule entouré de restes de la couche granuleuse nageant librement dans le liquide folliculaire. Ces restes de la couche granuleuse tantôt sous forme de cellules isolées (*a*), tantôt fusionnés sous forme de cellules géantes (*b*). On voit en outre quelques globules rouges du sang. L'épithélium folliculaire, qu'on ne voit que d'un côté seulement (*d*), est à l'état de dégénérescence: ce sont, pour la plupart, des cellules fusiformes réunies par leurs prolongements. Cette préparation est colorée par l'éosine et le bleu de méthylène.

Fig. 7. — Coupe d'ovaire d'une rate blanche. Ovisac avec ovule à l'état de segmentation dont on voit quelques débris (*a*); à côté de ces débris se trouvent isolées, ou bien fusionnées sous forme de cellules géantes, des cellules ressemblant tantôt aux cellules de la couche granuleuse, tantôt aux leucocytes. Ces cellules par place (*b*) s'accrochent aux débris de l'œuf. La préparation est fixée par le liquide d'Hermann et colorée avec de la safranine. Dessiné avec l'ocul. à l'immersion à l'huile, de Zeiss 1/13, et l'object. n° 4.

Fig. 8 et 9 (dans le texte). — La phase du début et celle de la fin de la dégénérescence graisseuse de l'ovule de chatte, avec formation autour de lui d'une plasmodie par les cellules de la couche granuleuse et de l'épithélium folliculaire. Fixation par le liquide de Flemming, coloration par la safranine.

Fig. 10. — Coupe d'ovaire d'une cobaye empoisonnée par la toxine diphtéritique. Ovule jeune en état de segmentation assez régulière, coloration par la safranine.

Fig. 11. — Une autre coupe du même ovaire. Débris d'ovule sous forme de sphères irrégulières restées non dévorées par les phagocytes au milieu d'un tissu conjonctif organisé.

ÉPIDÉMIE DE PESTE AU VILLAGE DE KOLOBOVKA

PAR LE PROFESSEUR V. TCHISTOWITCH.

Le village de Kolobovka, où a éclaté une épidémie de peste pendant la seconde moitié de l'été 1899, se trouve dans le département d'Astrakan, à 8 verstes de la ville de *Tsarev*. Il est situé sur le bord élevé de la petite rivière *Ahtouba*, un des bras du Volga, et entouré de steppes. Il y a dans ce village 3,500 habitants, tous Russes, qui sont pour la plupart cultivateurs de céréales et éleveurs de moutons. En été, la plus grande partie de la population se transporte habituellement dans les steppes, assez loin du village, pour les travaux des champs, et s'installe dans des baraques provisoires. Il en a été de même l'été dernier, de sorte qu'il ne resta au village que 550 personnes, trop vieilles ou trop jeunes pour travailler aux champs. Le premier cas de peste se manifesta le 16/28 juillet. *Marie Semakina*, 35 ans, sourde-muette, non mariée, habitant dans une des baraques de la steppe, tomba malade. Elle eut de la fièvre, des vomissements, de la toux avec expectorations sanguinolentes. Elle fut transportée au village où elle mourut le 21 juillet /2 août. A son enterrement vinrent ses plus proches parents. Deux d'entre eux tombent malades le 22 juillet /3 août, présentant les mêmes symptômes, et meurent 3 jours après. Ensuite, jusqu'au 9/21 août, il y eut toute une série de cas, surtout parmi les personnes en contact direct avec les malades. Il y eut en tout 24 cas de peste, dont 23 mortels. Les symptômes furent presque toujours les mêmes et la forme suraiguë.

Habituellement la mort survenait le deuxième, le troisième ou le quatrième jour au plus tard. La maladie débutait par un frisson, la température montait jusqu'à 40° et plus. Les malades se plaignaient de céphalalgie, de douleurs dans la poitrine et de faiblesse générale. Il y eut assez souvent des vomissements. Sur 24 malades, 17 avaient de la toux avec une abondante expectoration fluide et sanguinolente. Cependant, à la percussion, on ne

constatait pas de matité; à l'auscultation on trouvait des râles disséminés tantôt secs, tantôt humides. Le pouls était fréquent, jusqu'à 120 et 140 à la minute; la langue blanche, chargée. Quelques-uns des malades avaient sur la peau des pétéchies. Les bubons, proprement dits, faisaient défaut: cependant, chez certains malades les ganglions étaient douloureux et légèrement gonflés. Quant aux phénomènes nerveux, il y eut au début de la maladie de l'extrême lassitude, et ensuite de l'agitation semblable à celle de l'ivresse, qui se terminait par le coma. Souvent les malades gardaient toute leur conscience, même 2 ou 3 heures avant la mort.

Comme exemple je vais citer deux observations, où on trouvera l'exposé détaillé des examens anatomo-pathologique et bactériologique.

I. *Catherine Sémékina*, 54 ans, en soignant son mari, ressentit une grande lassitude le 3/18 août, température 38,9. Les 3 jours suivants la température fut normale, et la malade n'accusa que de la céphalalgie. Le 8/20 août elle eut des frissons, la température monta jusqu'à 39,4-40; pouls 104-112; elle eut des douleurs dans la poitrine et dans la région de l'omoplate gauche: faiblesse générale, de temps en temps était demi-comateux. Le 9/21 août, température 39,8-40,4, pouls 120-140, langue blanche, des pétéchies sur la peau. A l'auscultation: respiration rude, des râles. Le cou est douloureux à la région sterno-cléido-mastoïdienne. Le 10/22 août: mort.

A l'autopsie, faite le jour même de la mort par M. le professeur Lévine¹, on trouva dans la cavité pleurale du poumon gauche 400 c. c. environ de liquide séro-sanguinolent. Sur la plèvre et sur le péricarde, plusieurs ecchymoses.

Le tissu cellulaire du médiastin est œdématisé et présente plusieurs foyers hémorragiques. Le lobe intérieur du poumon gauche est hypertrophié et induré, la surface est d'un gris rougeâtre, pas granuleuse, présente des grands et des petits îlots confluents d'épanchements gélatino-hémorragiques, recouvrant le lobe. Le lobe supérieur du poumon gauche et tout le poumon droit sont hypérémis et œdématisés. Les ganglions trachéobronchiques sont hypertrophiés et ramollis. Les ganglions cervicaux et axillaires sont hypertrophiés et d'un rouge cerise. Les ganglions rétropéritonéaux ont subi les mêmes modifications, et le tissu cellulaire environnant est œdématisé et sert de siège à de multiples hémorragies. Les ganglions inguinaux et fémo-raux gauches sont aussi hypertrophiés et d'une coloration cerise pourpre. Dans le plus grand ganglion fémoral, on trouve sur la coupe deux foyers nécrotiques d'un jaune grisâtre. La rate est manifestement hypertrophiée, sa capsule est tendue, le parenchyme est d'un rouge cerise. Le foie est volumineux et mou: sur son enveloppe, vers le ligament suspenseur, des foyers

1. Je cite seulement les passages les plus importants du rapport beaucoup plus détaillé de M. le professeur Lévine.

hémorragiques: Dans les autres organes on n'a pas constaté de modifications notables.

II. *Barbe Zlobina*, 9 ans, tombe malade le 9/21 août au soir. A des vomissements : température 40°,4, pouls 160, délire dans la nuit. Le 10/22, au matin, température 39°,4, pouls 100; soir, température 39°,6, la langue blanche, vomissements, délire. Le 11/23 matin, température, 38°,5, pouls 100, la peau est sèche et chaude, expression d'angoisse du visage; soir, température 40°,3. Les ganglions inguinaux et cervicaux sont gonflés. Le 12/24 matin, température 38°,5, pouls 94, respiration 44. Tombe dans le coma : à 10 h. 1/2 matin, mort.

A l'autopsie, faite par M. le professeur Lèvine, on constate des pétéchies disséminées sur le thorax, les épaules et les cuisses, grosses tantôt comme une tête d'épingle, tantôt comme un pois. Des petites taches hémorragiques sur les feuillets de la plèvre, sur le péricarde, le péritoïne, sur les enveloppes muqueuses de l'estomac et des intestins. Poumons anémiés, perméables à l'air. Cœur dilaté, mou, son muscle à la coupe est d'un gris rougeâtre avec un reflet jaunâtre. Les ganglions axillaires, fémoraux, inguinaux, rétropéritonéaux, mésentériques sont augmentés de volume, mous, d'un rouge cerise sur la surface, à la coupe sont criblés d'hémorragies miliaires et de nodules grisâtres de sphacèle. Le tissu cellulaire environnant les ganglions est le siège de nombreuses hémorragies. La rate est augmentée de volume, son enveloppe est tendue, le parenchyme est ramolli, et d'un brun rougeâtre. Des hémorragies dans la capsule et les ligaments suspenseurs du foie. Reins hypertrophiés : leurs capsules présentent aussi de nombreux foyers hémorragiques. Le tissu cellulaire environnant les calices rénaux est complètement pénétré d'infiltations hémorragiques.

Outre ces deux cas, l'autopsie a été faite encore sur trois cadavres.

III. *Théodore Sémitkine*, 18 ans, tombe malade le 30 juillet/10 août. Meurt le 2/14 août. A l'autopsie, faite par M. le docteur Aroustamof, on trouva une hyperémie prononcée des lobes inférieurs des poumons, augmentation du volume de la rate, des hémorragies miliaires disséminées sur la plèvre, l'endocarde, et l'enveloppe muqueuse de l'estomac.

Dans les autres organes, pas de modifications importantes.

IV. *Marie Zlobina*, 58 ans, avait travaillé le 28 juillet/8 août, meurt le 30. Elle avait de la toux avec abondante expectoration sanguinolente : à l'auscultation on trouvait des râles sifflants; elle avait aussi de la fièvre, et à l'autopsie faite par MM. les docteurs Féodorof et Olchevsky, on trouva une induration du lobe supérieur du poumon gauche, présentant à la coupe des marbrures grisâtres.

A la pression, la surface de la coupe laissait échapper un liquide purulent et rougeâtre. La rate n'est pas hypertrophiée, elle est ferme. Le muscle cardiaque mou, d'une coloration jaunâtre.

V. *Jean Ponamaref*, 80 ans, tombe malade dans la nuit du 6/18 août, meurt le 7/19. Huit jours avant il avait de la céphalalgie et un point de côté. Le 6/18 il a des vomissements et des frissons. Le 7/19, au matin, temp. 39,2, soir 39,4, pouls 132. Les crachats sont mélangés de sang. L'autopsie est

faite par M. le Dr Schmidt. On constata seulement l'hypérémie des poumons, mais sans foyers d'induration, la présence d'un liquide sanguinolent dans la plèvre droite, et des ecchymoses sur cette plèvre.

Des études bactériologiques ont été faites sur trois des cinq autopsiés à Kolobovka : on avait fait des cultures avec les organes, des frottis des sucs d'organes des deux dernières mortes (Catherine Sémekina et Barbe Zlobina). Les premières études bactériologiques étaient faites à Kolobovka même par MM. les Drs Aroustamof et Schmidt, le professeur Lévine et M. Tartakovsky, qui reconnurent que la maladie à laquelle ils avaient affaire était la peste. Ensuite M. le professeur Wyssokovitch et moi, nous avons été appelés à Kolobovka, et, en présence de M. le professeur Lévine, nous avons fait des contre-expériences sur les matériaux recueillis à Kolobovka. Ces expériences de contrôle ont été exécutées à Astrakan, au laboratoire de l'Administration des pêcheries.

Dans les frottis faits avec le suc des organes des personnes mortes à Kolobovka, on trouvait constamment de nombreux bâtonnets en tout semblables à ceux de la peste. Ils étaient surtout nombreux dans les préparations faites avec le suc du poumon et de la rate de Sémekina et de la rate de Zlobina. Dans les coupes de ces organes, nous avons trouvé également une grande quantité de ces mêmes bâtonnets.

En outre, nous avons examiné trois cultures préparées par M. le professeur Lévine ; une faite avec du poumon de Sémekina, une autre avec de la rate de Zlobina, et une troisième obtenue des organes d'une souris qui avait été intoxiquée avec de la rate de Sémekina. Les deux premières cultures étaient identiques à celle de Bombay : bâtonnets courts, immobiles, arrondis à leurs extrémités, ne se colorant pas par le Gram, se développant dans du bouillon sans le troubler. Sur la gélose au bout de 24 heures, à 37°, enduit gluant d'un blanc laiteux. Dans la gélose sucrée, pas de fermentation. Les inoculations tuaient les souris au bout de 2 ou 3 jours et les cobayes le sixième jour. Il se formait à l'endroit même de cette inoculation une infiltration hémorragique avec gonflements des ganglions lymphatiques les plus proches. La rate augmentait de volume. Chez les cobayes, à l'autopsie, on voyait, dans la rate et les poumons, des nodules blanchâtres entourés d'une auréole rouge formée par le tissu

hyperémié. Sur les frottis fait avec l'xsudat formé à l'endroit de l'inoculation, avec le suc de la rate, des poumons, des ganglions lymphatiques et enfin le sang, on trouvait de nombreux bâtonnets de la peste, avec la coloration bi-polaire si caractéristique. Ils étaient en plus grande quantité dans les nodules des poumons et de la rate, et en moindre quantité dans le sang.

Les cultures ne sont pas pathogènes pour les pigeons.

Dans la troisième culture préparée par M. le professeur Lévine, avec des organes de la souris qui fut inoculée à Kolobovka avec de la rate de Sémékina, on trouvait des bâtonnets qui ressemblaient beaucoup à ceux de la peste, et qui étaient pathogènes pour les souris.

Cependant ils se distinguaient des bâtonnets types de la peste par leur développement plus rapide et plus copieux dans les milieux nutritifs, et ils provoquaient la formation de bulles de gaz dans la gélose sucrée. Ce bâtonnet mérite d'être mieux étudié; il est possible qu'il soit une variété des bâtonnets de la peste ou bien un bâtonnet pseudo-pesteux.

Toutes ces études nous permirent de reconnaître, dans notre rapport présenté le 18 septembre à la Commission de la lutte contre la peste, que l'épidémie qui avait éclaté à Kolobovka était bien une épidémie de peste.

Plus tard, toutes les cultures obtenues à Kolobovka furent de nouveau analysées au fort Alexandre I, près Cronstadt. À ces nouvelles études prirent part les professeurs K. Vinogradof, S. Vinogradsky, N. Tchistovitch, A. Lévine, K. Raptchevsky, M. Tartakovsky, les docteurs Zabolotny, Schmidt et Dsienkovsky. Voici les conclusions de ces bactériologistes :

1) Les cultures présentées par MM. le professeur Lévine, M. Tartakovsky et docteur Schmidt et préparées par ces personnes avec des organes de trois malades (Ponamaref, Sémékina et Zlobina) morts à Kolobovka, ne se distinguent les unes des autres par aucun caractère important.

2) La forme et l'aspect du microbe, ainsi que les particularités de son développement dans des différents milieux de culture, — bouillon, viande pepto-gélatine, viande pepto-gélose, gélose sucrée, et enfin lait, — correspondent exactement à celles du microbe de la peste bubonique.

3) Au même type répondent aussi les propriétés pathogènes

de toutes les cultures analysées au fort. Le microbe cité, injecté sous la peau à une dose modérée, tue les souris en 40-75 heures, les rats en 40-54 heures, les cobayes en 72 heures-cinq jours. Un singe (*macacus rhesus*), auquel on avait fait une injection sous-cutanée au bras, eut, 24 heures après, 39°,6 et un bubon axillaire du côté correspondant à l'injection.

L'autopsie des animaux ayant succombé à la suite des inoculations de cultures présenta le tableau habituel de la peste expérimentale.

Les études bactériologiques des différents organes de ces animaux donnèrent les mêmes résultats.

4) L'examen microscopique des coupes d'organes des deux personnes mortes à Kolobovka (Zlobina et Sémékina) permit de constater la présence dans ces organes d'une grande quantité de bactéries identiques à celles qui étaient trouvées dans les cultures qu'on avait étudiées au fort, et qu'on rencontre habituellement dans les cadavres des personnes mortes de la peste bubonique.

Ainsi, il est établi avec évidence que la maladie qui avait fait son apparition à Kolobovka fut bien la peste, et en outre la peste dans sa forme la plus maligne. Dans les deux cas (Catherine Sémékina et Marie Zlobina), qui furent étudiés avec le plus de détails, la peste avait revêtu la forme pneumonique, et dans le troisième (Barbe Zlobina), on constata le gonflement général des ganglions. Les études bactériologiques des organes de cette dernière malade démontrent que c'était un cas d'infection mixte par les bacilles de la peste, qui se trouvaient en grand nombre, surtout dans la rate, et par les diplo-streptocoques. Le quatrième cas (Theodore Sémékine) était la forme pneumonique pas complètement évoluée. On constatait un grand nombre de bacilles dans la rate et dans le sang.

La marche de la maladie fut très rapide à Kolobovka; elle tuait promptement, avant que les phénomènes locaux puissent s'établir manifestement. Et probablement, c'est par cette haute virulence des bacilles qu'on peut expliquer la particularité de la peste de Kolobovka : sa forme exclusivement pneumonique et septique et l'absence de bubons caractéristiques.

Comment la peste fut-elle importée à Kolobovka? Cette question reste en suspens. Il est possible qu'elle soit venue à

Astrakhan de la Perse, par les pèlerins musulmans, ou, ainsi que le suppose M. le Dr Zabolotny, qu'elle vienne de Mongolie : dans les steppes, s'étendant du Volga à l'Oural, il y a de nombreux Kalmouks bouddhistes nomades.

Avant de terminer, je veux dire quelques mots sur les mesures qui furent prises dans le but de faire cesser l'épidémie. Ces mesures, exécutées sous la surveillance de M. le Président de la Commission de la lutte contre la peste, Son Altesse le prince d'Oldenbourg, consistaient en un isolement complet de la localité infestée. Kolobovka avec la steppe voisine fut entourée par un cordon formé d'abord par les habitants, et ensuite par des soldats. Ce cordon s'étendait le long de 195 verstes. Tous les habitants de la localité furent enregistrés. Les malades étaient transportés dans une maison spéciale qui fut transformée en hôpital. Une autre maison recevait en observation les malades suspects. Les maisons où il y avait eu des cas de peste furent fermées, scellées et brûlées ensuite ; on désinfectait celles qui lesavoisinaient. Le village fut divisé en quartiers ; dans chaque quartier, il y eut un enquêteur, qui deux fois par jour faisait sa ronde dans le quartier, faisait l'appel des habitants et prévenait à l'hôpital s'il y avait un nouveau cas de maladie.

Sur 2 points du cordon il y avait des passages. A l'un d'eux, on avait installé le poste d'observation, muni d'une chambre de désinfection, de bain, et de petites maisonnettes destinées à loger pendant une dizaine de jours de quarantaine les personnes qui devaient quitter la localité infestée.

Les points de passage étaient reliés entre eux et avec la ville de Tsarev par le téléphone. Les morts furent enterrés dans un cimetière spécial et leurs tombes remplies et recouvertes d'une épaisse couche de chaux.

Le 23 août, on commença les inoculations préventives du liquide-sérum de Hafkine. On inocula, en tout, environ 4,000 individus : il ne resta que 40 personnes non inoculées.

La dernière malade qui fut atteinte le 1^{er} août guérit : depuis il n'y eut plus de cas de peste à Kolobovka.

Après avoir brûlé les maisons infestées, et désinfecté celles qui lesavoisinaient, le 12 septembre, le cordon de Kolobovka fut levé, mais le poste d'observation y restera jusqu'au printemps.

SUR LA FERMENTATION DU GALACTOSE

ET SUR L'ACCOUTUMANCE DES LEVURES A CE SUCRE

PAR FRÉDÉRIC DIENERT

Travail du Laboratoire des fermentations, à l'Institut agronomique.

HISTORIQUE

Le galactose est un hexose stéréoisomère du glucose, et pourtant fermente beaucoup moins facilement que lui. Divers savants, Kiliani, Koch, Hayduck et Herzfeld, ont même soutenu qu'il n'était pas fermentescible. Bourquelot a montré qu'il l'était lorsqu'il était accompagné d'un autre sucre, et ne l'était plus lorsqu'il est purifié. Les contradictions rencontrées dans cette voie tiennent. on le sait maintenant, à deux causes principales. La première, signalée par Tollens et Stone, est que le galactose, qui ne fermente pas dans l'eau pure, peut fermenter avec la même levure quand on ajoute au liquide des aliments azotés. La seconde, signalée par Fischer et Thierfelder, est que l'action dépend de la levure.

Certaines levures attaquent le galactose, tandis que d'autres, dans les mêmes conditions, laissent ce sucre intact. Sous ce point de vue il n'y a pas de différence entre les levures hautes et les levures basses. Ce dernier résultat a été contredit par M. Neumann Wender, mais de récentes expériences de M. Bau ainsi que les miennes confirment les conclusions de MM. Fischer et Thierfelder.

L'existence de levures ne faisant pas fermenter le galactose fut confirmée par les expériences de MM. Voit, Cremer et Bau.

Tous ces faits soulèvent des problèmes curieux, quand on les envisage au point de vue de la production de la zymase alcoolique. Il faut que cette zymase existe ou fonctionne dans certaines levures et pas dans d'autres; que dans une même levure, elle apparaisse dans certains cas et pas dans d'autres. Tout ce qui est relatif à cette question de sécrétion de diastases est en ce moment du plus haut intérêt pour la

science, et j'ai essayé de résoudre quelques-uns de ces problèmes.

Un travail récent de M. Dubourg, paru pendant le cours de mes recherches, a déjà jeté un certain jour sur l'action des levures inactives vis-à-vis du galactose. En étudiant la fermentation des saccharides au moyen de levures reconnues comme inactives vis-à-vis de ceux-ci, ce savant découvrit qu'il suffisait d'employer un milieu riche en azote et d'ajouter au saccharide considéré un peu de glucose pour obtenir la fermentation des deux sucres. Ces résultats sont également vrais quand on remplace le saccharide par le galactose.

Dans le cours de ce travail, en même temps que je montrerai la relation étroite qui unit les levures actives et inactives vis-à-vis du galactose, je ferai voir les changements importants qui surviennent dans l'intérieur d'une cellule à la suite du remplacement d'un hydrate de carbone par un autre.

I

TECHNIQUE

Préparation du galactose pur. — La première condition pour commencer notre étude, c'est d'avoir du galactose pur. Le galactose pur du commerce est mélangé de glucose. C'est ce dernier sucre qu'il faut éliminer. M. Bourquelot avait pour cela fait cristalliser ce sucre dans l'alcool. Le glucose y est soluble, le galactose l'est très peu.

Sa méthode était longue et même quelquefois incertaine. J'ai jugé préférable d'employer un autre procédé déjà signalé par M. Bau, qui consiste à dissoudre le galactose dans un milieu nutritif et à ensemencer dans ce milieu une levure inactive vis-à-vis du galactose. Comme milieu nutritif, j'employai l'eau de touraillons, et je remplaçai le *Saccharomyces apiculatus* de M. Bau par le *S. Ludwigii* dont l'activité était plus grande. Cette levure consomme tout le glucose et laisse inattaqué le galactose. La fermentation finie, on évapore le liquide de façon à le concentrer, on traite le liquide au noir animal pour le décolorer en partie, et on reprend par l'alcool bouillant. Par refroidissement le galactose cristallise. Une deuxième cristallisation est nécessaire.

J'ai vérifié ce procédé de purification de manière à voir si seul le glucose était attaqué.

J'ai fait pour cela des mélanges de galactose purifié d'après la méthode de M. Bourquelot, c'est-à-dire au moyen de l'alcool, avec du glucose pur. Je dissous ces mélanges dans l'eau de touraillons pure, ou additionnée de 10/0 de peptone ou de 10/0 de phosphate d'ammoniaque. J'enensemence ces milieux au moyen du *S. Ludwigi*. Le dégagement gazeux terminé, je dose le sucre restant au moyen de la liqueur de Fehling. Quel que soit le milieu, j'ai obtenu des résultats semblables dont voici quelques exemples :

Sucre introduit en milligr.		Sucre restant en milligr.	
Glucose.	Galactose.	Galactose.	—
—	—	—	98
203	94	140	—
152	142	186	—
101	188	—	—

Ces quelques chiffres suffisent pour montrer que le glucose seul a disparu et qu'on retrouve inattaqué tout le galactose introduit.

Cette méthode de purification du galactose en dissolution dans l'eau de touraillons est commode lorsqu'on veut obtenir une solution de galactose pur dans ce milieu nutritif. Il suffit d'évaporer au bain-marie le liquide, et de reprendre par l'eau l'extrait débarrassé de l'alcool et d'une grande partie de sa glycérine.

Pour obtenir le galactose pur et cristallisé, j'ai modifié cette méthode.

Je cultive le *Saccharomyces Ludwigi* dans l'eau de touraillons additionnée de 10/0 de glucose. La levure se développe et fait rapidement disparaître le sucre. On soutire alors le liquide fermenté qu'on remplace par une solution stérilisée de galactose dans l'eau distillée : la levure n'a pas été enlevée par le soutirage. Nous verrons à la fin de ce chapitre la méthode suivie pour soutirer aseptiquement le liquide de fermentation.

L'impureté principale, le glucose, disparaît très vite sous l'action de la levure. Le galactose reste mélangé à un peu d'impuretés provenant de la levure. On évapore alors en partie le liquide filtré et on fait cristalliser le galactose. Cette première cristallisation reprise par l'alcool concentré et chaud donne par le refroidissement un galactose très pur.

Procédés de dosage. — J'ai opéré à l'aide de la liqueur de Fehling préparée d'après la formule de Pasteur, pour le dosage

des solutions de galactose. Quand j'avais affaire à un mélange et quand l'emploi du saccharimètre manquait de précision, je me suis servi d'une méthode que voici :

On prélève d'abord une certaine quantité de liquide sucré et on y dose le sucre total au moyen de la liqueur de Fehling.

La seconde portion de ce liquide sucré est stérilisée, additionnée au besoin d'eau de touraillons, et ensemencée avec le *S. Ludwigi*.

La fermentation finie, on détermine le sucre restant par un nouveau titrage à la liqueur cupropotassique, qui donne le galactose restant. Connaissant la quantité totale de sucre et la quantité de galactose restant, il est facile d'obtenir la proportion de sucre mélangé au galactose.

Quand dans le mélange de sucres se trouve du lactose, on remplace le *S. Ludwigi* par une levure de bière très active qui laisse intact ce dernier sucre.

Il m'est arrivé de rechercher la proportion de deux sucres dissous dans un liquide renfermant un antiseptique. J'ai alors modifié un peu la méthode. On commence par cultiver le *S. Ludwigi* dans l'eau de touraillons additionnée de 2 0/0 de glucose. La fermentation finie, on sépare la levure du liquide fermenté en opérant comme nous allons bientôt l'indiquer. On porte alors la levure développée dans le mélange des deux sucres préalablement stérilisés et dilués de façon à diminuer l'influence de l'antiseptique. Après la fermentation, il ne reste plus que du galactose.

J'ajouterais que cette méthode a été préalablement expérimentée, et les résultats nous ont démontré l'exactitude des nombres à 1/50 près.

Dosage du CO₂ dégagé. — Dans certaines expériences j'ai été obligé de doser directement la quantité de sucre fermenté en analysant la quantité de CO₂ dégagé pendant la fermentation. Dans des ballons d'un volume assez grand, de façon à ne pas avoir intérieurement une pression de plus de 3 atmosphères, la fermentation terminée, j'introduisais le liquide à fermenter. Après stérilisation j'ensemencais, je faisais le vide dans le ballon au moyen de la trompe à eau.

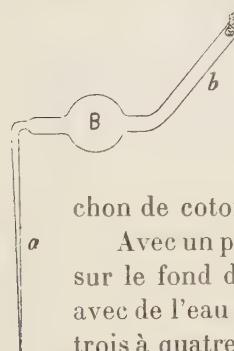
Il restait encore un ou deux centimètres cubes d'air qui suffisaient pour favoriser le développement de la levure. Je fermais les ballons à la lampe et, la fermentation terminée, j'extrayais le

gaz au moyen d'une trompe à mercure. Je dosais le CO_2 récolté sur le mercure. La quantité de gaz trouvée était transformée d'après la formule



en glucose disparu.

Technique employée pour récolter d'une manière aseptique une certaine quantité de levure pure. — Le procédé simple que j'ai employé était le suivant. Je cultive les levures dans des ballons ordinaires (matras Bohème). Le sucre disparu, je soutire le liquide fermenté au moyen d'un siphon de 3% de diamètre préalablement fermé à la lampe et flambé à 180° .



Afin d'éviter l'introduction des poussières par suite de l'aspiration d'air que produit le siphonnement, le siphon était maintenu contre le col du ballon au moyen du bouchon de coton.

a Avec un peu d'habitude, la levure reste en grande partie sur le fond du ballon. On la lave alors une première fois avec de l'eau distillée stérile et on la laisse se déposer pendant trois à quatre heures dans un lieu frais. La levure une fois déposée, on soutire le premier liquide de lavage et on le remplace par de l'eau distillée également stérile. On agite bien le ballon de façon à mettre en suspension la levure qu'on enlève ensuite immédiatement du ballon. Un instrument commode pour faire cet enlèvement est une pipette flambée à 170° , de la forme indiquée sur la figure. Elle se compose d'une boule B, terminée par deux tubes recourbés a et b. Le tube a a 3 millimètres de diamètre; comme le siphon, il est fermé à la lampe. Le tube b a 7 millimètres de diamètre et est bouché par un tampon de coton. C'est de ce côté qu'aura lieu l'aspiration. Le tube a plonge dans le ballon. Sa pointe a été cassée et flambée avant d'être introduite dans le ballon. On aspire par b; le liquide et la levure arrivent dans la boule B.

On enlève la pipette du ballon et la levure est portée dans un tube à essai, vide et préalablement stérilisé. Celle-ci se dépose au fond du tube et, 12 heures après, le liquide surnageant est enlevé au moyen d'un siphon. La levure ainsi déposée au fond

d'un tube sera désignée par abréviation, dans le cours de ce travail, sous le nom de *levure en masse*.

L'ensemble des deux lavages ne doit pas durer plus de 24 heures, sinon les cellules vieillissent, leur intérieur devient granuleux et les expériences ne sont plus comparables.

Toutes les fois que j'ai eu besoin d'une certaine quantité de levure pure, je me suis servi de ce procédé.

II

FERMENTATION DU GLUCOSE ET DU GALACTOSE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX

Précédemment j'ai indiqué que MM. Fischer et H. Thierfelder avaient découvert certaines levures n'attaquant pas le galactose. Dans ce chapitre je compareraï l'action d'une même levure se développant dans le même milieu nutritif azoté, mais sucré soit avec du glucose, soit avec du galactose ; je laisserai donc de côté les levures inactives vis-à-vis du galactose ; et toutes les levures que j'ai ensemencées dans les expériences suivantes décomposent le galactose comme le glucose en alcool et en acide carbonique.

Je signalerai en passant la fréquence avec laquelle on rencontre ces levures inactives vis-à-vis du galactose. Ainsi, en ensemencant 89 espèces de levures de la collection du laboratoire dans l'eau de touraillons additionnée de 1 0/0 de peptone et de 4 0/0 de galactose pur du commerce, c'est-à-dire dans d'excellentes conditions de nutrition, nous en avons trouvé 23 0/0 qui ne purent faire fermenter le galactose. Cette proportion est à peu près de 1/5, c'est-à-dire assez élevée.

Fermentation du galactose et du glucose dans différents milieux.

— Je me suis d'abord demandé quelle était l'influence, sur la fermentation des deux sucres, de diverses substances ajoutées au milieu de culture.

Pour cela j'enseigne une levure dans les trois milieux nutritifs suivants :

Eau de touraillons additionnée de 20 0/0 de galactose ou 30 0/0 de glucose.
Mêmes milieux + 2 0/0 peptone.

— + 2 0/0 phosphate d'AzH³.

Pour deux levures j'ai obtenu les résultats suivants :

Milieu de culture.	Alcool en vol. %.	Poids de lev. milligr.
Levure Bass.	—	—
Eau de touraillons + glucose	11,12	48
— + galactose	3,30	50
— + peptone + glucose	16,60	48
— + — + galactose	5,00	52
— + phosph. AzH_3 , glucose	12,37	49
— + — + galactose	3,40	51
Levure de Frohberg.	—	—
1) E. de t. + glucose	7,28	35
2) E. de t. + galactose	5,00	31
3) E. de t. pept. + glucose	9,12	39
4) E. de t. — + galactose	7,00	40
5) E. de t. phosph. + glucose	8,12	50
6) E. de t. — + galactose	5,25	51

L'examen de ces chiffres montre déjà que la quantité maximum d'alcool fourni par la levure augmente quand on ajoute de la peptone ou du phosphate d'ammoniaque. L'augmentation a lieu quel que soit le sucre employé.

Mais ces résultats mis sous une autre forme feront mieux voir la non-influence du sucre. Faisons en effet pour un milieu donné le rapport $\frac{\text{alcool du milieu glucose}}{\text{alcool du milieu galactosé}}$ nous trouvons pour ce rapport :

Milieux de culture	Levure Bass.	Levure Frohberg.
Eau de Touraillons	3,34	1,45
— — + peptone	3,32	1,30
— — + phosphate	3,62	1,54

Pour chaque levure, le rapport ainsi formé est à peu près constant, ce qui revient à dire que l'addition de peptone ou de phosphate augmente dans un même rapport la proportion de glucose décomposé par la levure ainsi que celle du galactose.

En passant, nous constatons que l'azote augmente la quantité d'alcool produite, c'est-à-dire diminue l'influence nocive de ce corps. Cette remarque a été utilisée par M. Dubourg pour rendre actives des levures inactives.

Influence des acides sur la fermentation du galactose et du glucose.

J'ai examiné de même l'influence des acides sur la fermentation du galactose. Je ne citerai pour exemple que le cas de l'acide tartrique, les autres acides se comportant comme celui-ci.

Rajeunissons nos levures dans des matras Pasteur contenant de l'eau de touraillons additionnée soit de glucose, soit de galactose. Les levures rajeunies sont ensemencées dans des tubes contenant des doses variables d'acide tartrique, 0,5 0/0, 1 0/0,

1,5 0/0, etc., et 4 0/0 de sucre qui était pour les uns du glucose, pour les autres du galactose.

Si on examine les tubes contenant du glucose, on voit que la levure s'y développe, quelle que soit l'origine de la semence, mais il n'en est pas de même des tubes contenant du galactose. On constate que les levures rajeunies préalablement en présence de galactose supportent dans ces conditions des doses d'acides plus fortes que celles rajeunies seulement en présence du glucose. Ainsi 2 0/0 d'acide arrêtaient ou empêchaient la fermentation du galactose avec ces dernières levures et non avec les premières.

Nous constatons donc l'influence de l'origine de la semence; et sur ce sujet nous aurons l'occasion de revenir.

Au microscope il est impossible de constater une différence dans la forme des cellules qui se révèlent ainsi inégales.

Si on écrase sous la lamelle du microscope une levure, en appuyant au moyen d'un agitateur qu'on déplace, on constate que les cellules se rompent plus ou moins facilement. Les cellules rondes se déchirent plus facilement que les cellules allongées, et les grandes mieux que les petites. Mais l'âge ainsi que l'accoutumance à un sucre (glucose ou galactose) ne facilitent ni ne retardent cet écrasement des cellules.

Si donc la culture d'une levure sur un milieu nutritif additionné de galactose diffère de la culture de la même levure sur un milieu nutritif additionné de glucose, ce sera par la physiologie de la cellule et non par sa morphologie.

III

ACCOUMANCE DES LEVURES AU GALACTOSE

Nous venons de reconnaître l'influence possible de l'origine de la semence sur la fermentation du galactose.

D'autres expériences nous permettent de constater le même fait. Je citerai par exemple celle-ci : J'ensemence dans du liquide Laurent, additionné de 0,5 0/0 de peptone et de 4 0/0 de galactose, une levure développée depuis 1 mois dans un matras Pasteur. Si ce dernier avait renfermé préalablement du glucose, la levure ne se développe pas dans le liquide Laurent. Si au lieu de glucose le matras avait renfermé du galactose, la levure se développe très bien.

Avec une levure ensemencée jeune, l'influence de l'origine de la semence est nulle.

Pour mieux nous rendre compte de cette influence, changeons notre manière d'opérer et réduisons au minimum la multiplication de la levure pendant la durée de nos essais. Si une levure cultivée dans un même milieu en présence de différents sucres possède des propriétés différentes, celles-ci persisteront tant que les levures ne se multiplieront pas et il sera facile de les mettre en évidence.

Pour rendre minima la multiplication, nous avons opéré de la manière suivante : dans 100 c. c. d'un milieu nutritif donné, on cultive une levure pure. En employant le procédé décrit au chapitre I, on décante la levure et on la place dans des tubes. On obtient de cette façon dans chaque tube de 0^{gr},100 à 0^{gr},130 de *levure en masse*. En faisant agir cette levure en masse sur 5 c. c. d'une solution de glucose ou de galactose, nous faisons une fermentation avec 20 fois plus de levure qu'il ne s'en serait développé si on avait ensemencé ce volume de liquide avec une trace de levure. On est donc dans les conditions connues depuis Pasteur et Brown comme ralentissant beaucoup ou même empêchant la multiplication. J'appellerai pour abréger *levure habituée à un sucre donné*, une levure obtenue en la cultivant dans l'eau de touraillons additionnée du sucre considéré.

Expérience I. — Prenons un certain nombre de tubes renfermant de la levure en masse habituée soit au glucose soit au galactose. Dans chacun j'introduis 5 c. c. d'une solution de galactose à 60/0. On les place à l'étuve à 25° et on note le moment où on peut compter 1 bulle gazeuse par seconde. Ce moment est considéré comme le commencement de la fermentation. Tous les tubes renfermant la levure habituée au galactose fermentent au bout de 2 heures. Ceux qui renferment la levure habituée au glucose restent pendant 24 heures et souvent plus longtemps sans manifester la moindre fermentation. La même expérience répétée en remplaçant la solution de galactose par 5 c. c. d'une solution de glucose ne permet pas de différencier les levures accoutumées ou non au galactose.

Donc en réduisant, comme nous le faisons, la multiplication, nous constatons une très grande différence entre le moment où la fermentation du galactose commence dans les tubes renfer-

mant des levures habituées à ce sucre et dans ceux renfermant des levures habituées au glucose. Une fois la fermentation du galactose commencée par ces dernières, elle marche aussi vite qu'avec les levures habituées au galactose. Il faut donc penser qu'un travail intérieur a dû se faire pendant la période d'inactivité de la levure.

Nous laissons de côté pour le moment les levures de lactose. C'est que celles-ci, habituées au glucose, manifestent une certaine habitude au galactose. Ainsi, au bout de 2 heures, chez certaines de ces levures habituées au glucose, on obtient un commencement de fermentation du galactose, mais il faut ajouter qu'habituées au galactose ou au lactose ces levures manifestent une activité vis-à-vis du galactose presque inconnue chez les autres. Voici en effet quelques nombres.

Levure lactose.	Origine.	La fermentation commence après
DUCLAUX.	Saccharose.	24 heures.
	Galactose.	1 heure.
KAYSER.	Saccharose.	2 heures.
	Galactose.	1 heure.
	Lactose.	30 minutes.

L'acclimatation est donc encore ici manifeste. Elle est plus sensible encore quand on habitue les levures au lactose.

Expérience II. — Les résultats de la première expérience se rapportent à des levures habituées au glucose ou au galactose. Voyons l'action des autres sucres (lévulose, saccharose, maltose, mélibiose, lactose).

Dans des tubes renfermant une *levure en masse* habituée à l'un ou l'autre de ces sucres, nous introduisons c. c. d'une solution de galactose. Si nous désignons par *Tm* le temps mort pendant lequel toute fermentation semble nulle dans les tubes, nous obtenons les résultats suivants avec deux levures :

	Origine.	T. m.
Levure de lactose.	Saccharose.	2 heures.
	Galactose.	1 heure.
	Lactose.	1/2 heure.
	Maltose.	2 heures.
Levure de Frohberg.	Glucose.	2 jours.
	Saccharose.	2 jours.
	Lévulose.	2 jours.
	Mélibiose.	1 heure.
	Galactose.	1 heure.

Le saccharose, le glucose, le lévulose, le maltose, c'est-

à-dire tous les sucres qui ne peuvent par hydrolyse donner du galactose, donnent des levures qui manifestent un temps mort considérable quand on les met *en masse* en présence de galactose. Au contraire le lactose et le mélibiose, sucres qui, sous l'action des acides ou de diastases, la lactase ou la mélibiase, donnent du glucose et du galactose, sont les seuls avec le galactose capables d'acclimater les levures à ce sucre.

Les mêmes levures habituées à ces différents sucres, mais qui reçoivent du glucose en place de galactose, ne manifestent aucun temps mort comme précédemment avec le galactose, l'activité étant sensiblement la même quel que soit le sucre duquel la levure tire son origine.

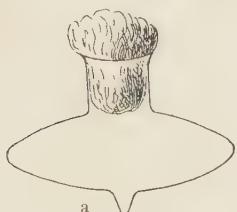
Je dis sensiblement la même, car si on prend une levure habituée au glucose et au lévulose par exemple, et qu'on la fasse agir sur une solution de glucose, on constate chez la première une activité légèrement supérieure. Avec ces mêmes levures, mais mises en présence d'une solution de lévulose, l'ordre est inverse : cependant ces différences sont si faibles que nous les négligerons.

En résumé, toute levure faisant fermenter le galactose a dû s'habituer préalablement à ce sucre. Cette condition n'est pas nécessaire pour le glucose. Cette différence est très importante.

Expérience III. — Pour bien montrer les conditions nécessaires de cette différence entre les levures habituées au galactose et celles qui ne le sont pas, modifions un peu le dispositif de l'*expérience I.* Prenons trois ballons aplatis comme l'indique la figure. Dans chacun de ces ballons nous introduisons 400 c. c.

d'eau de touraillons additionnée dans l'un de glucose, dans un second de maltose et dans le troisième de galactose. On ensemente et, une fois la levure développée, on soutire le liquide en faisant en sorte que la levure reste au fond du ballon. Celle-ci est lavée, et on s'arrange de façon que toute

la levure reste dans la petite cuvette *a*. L'eau de lavage est remplacée par une solution de galactose. 24 heures après, on analyse chaque ballon et on trouve :



	Sucre fermenté %
Ballon renfermant eau de touraillons glucose.....	3,80
— — maltose.....	3,70
— — galactose.....	4,02

La levure en masse a pu se multiplier sur le fond du ballon et a permis aux cellules de s'accoutumer rapidement au galactose au point de rendre nulle l'influence de leur origine.

Rapport entre l'activité de la fermentation du glucose et celle du galactose. — Si on fait agir une levure habituée au galactose sur une solution de glucose ou une solution de galactose, on constate qu'il existe un rapport entre les quantités de glucose et de galactose fermentées par un poids donné de levure au bout de 24 heures.

Voici quelques valeurs trouvées pour ce rapport R avec différentes levures.

Levure	Poids de levure en milligr.	Valeur de R.
Levure Bass.	108	1,6
Levure distillerie Alfort	91	1,65
Levure de vin N° 6	85	1,5

Pour toutes les levures que j'ai étudiées après les avoir habituées au galactose, ce sucre fermente 1,6 fois moins vite que le glucose. Chez les levures habituées au glucose, la valeur de R au bout de 24 heures est généralement égale à ∞ . A mesure que la levure s'accclimate, ce rapport diminue.

Cette valeur de $R = 1,6$ nous sera utile dans un chapitre prochain pour nous rendre compte du degré d'accoutumance des levures au galactose. La valeur de R pour les levures de lactose habituées au glucose est égale à 4 ou 5 après 24 heures. Nous dirons que ces levures sont en partie accoutumées au galactose¹.

1. MM. Buchner et Rapp, opérant avec la zymase alcoolique qu'ils retirèrent de levures non acclimatées, ont trouvé les quantités suivantes de CO_2 dégagé en présence de 1 0/0 de toluène.

Sucre.	Concentration.	CO ₂ dégagé après		
		16 heures.	24 heures.	40 heures.
Glucose	3%	0,40	0,61	0,70
Galactose	3%	0,08	0,11	0,12
Valeur de R.		5	5,5	5,8

Les valeurs de R qu'on tire des résultats de MM. Buchner et Rapp sont plus élevées que celles tirées de nos expériences.

Durée de l'acclimatation. — L'accoutumance une fois établie chez une cellule persiste-t-elle, et dans quelles conditions persiste-t-elle? Pour le savoir, on peut prendre une série de tubes renfermant de la *levure en masse* habituée soit au glucose soit au galactose. Je désignerai par des numéros impairs 1 et 3 les tubes renfermant les levures habituées au premier sucre, et par des numéros pairs 2 et 4 ceux renfermant les levures habituées au galactose.

Ceci fait, j'ajoute 4 c. c. d'une solution de glucose à 31 0/0 dans les tubes 1 et 2, et 4 c. c. d'une solution de galactose à 10,91 0/0 dans les tubes 3 et 4.

Le temps mort est de 1 heure dans les tubes 1, 2 et 4, il est de 24 heures dans le tube 3.

Au bout de 5 jours la fermentation est terminée, sauf dans le tube 3 où tout dégagement gazeux cesse seulement au bout de 10 jours. Aussitôt la fermentation achevée dans un tube, on soutire le liquide fermenté, on lave la levure à l'eau distillée et on y introduit une nouvelle solution sucrée.

Les tubes 1, 2 et 3 reçoivent deux c. c. d'une solution de galactose à 7,09 0/0 et le tube 4 deux c. c. d'une solution de glucose à 10 0/0.

Une heure après l'introduction du liquide sucré, le dégagement gazeux commence dans les tubes 3 et 4, et seulement au bout de 4 heures dans le tube 2. La levure du tube 3 s'est donc accoutumée au galactose, celle du tube 2 a conservé une partie de ses anciennes propriétés, malgré la proportion assez grande de glucose que cette levure a dû décomposer. Son accoutumance n'a donc pas disparu.

La levure du tube 1, épuisée par une première fermentation de glucose, renfermant un protoplasma vieilli, n'a cependant pas perdu la propriété de s'habituer au galactose. Elle y met beaucoup plus de temps que précédemment la levure du tube 3. Son temps mort est de 4 jours au lieu de 24 heures, mais ce temps est sans importance, cette levure s'accoutume encore.

L'exemple que je viens de rapporter est relatif à une levure qui s'acclimate assez facilement.

Je résume dans un tableau synoptique l'exemple d'une autre levure (une levure de bière haute : la levure Bass) qui compte parmi les plus longues à s'acclimater.

Tube 1.	Tube 2.	Tube 3.	Tubé 4.			
reçoivent 4 c. c. solution de glucose.			reçoivent 4 c. c. solution de galactose.			
2 heures.	2 heures.	48 heures.	2 heures.			
La fermentation commence après						
5 jours.	5 jours.	10 jours.	5 jours.			
Tout dégagement gazeux cesse après						
galactose.	galactose.	galactose.	glucose.			
On ajoute après la fin du dégagement gazeux du						
5 jours.	12 heures.	1 heure.	1 heure.			
La fermentation commence après						

On ajoute du galactose dans le tube 4, la fermentation commence au bout de 12 heures.

Ces deux exemples nous montrent donc que lorsqu'une levure accoutumée au galactose fait fermenter du glucose, elle perd en partie son acclimatation. Mais dans le cas de levure en masse, cette perte n'est que partielle. Avec la levure Bass, où cette perte est maximum, une levure ainsi traitée se rappelle encore très bien son acclimatation primitive.

Cette propriété est donc d'une stabilité relative, mais il reste acquis que la présence du galactose est nécessaire pour que l'accoutumance reste maximum. C'est ce qui arrive également chez les animaux qui perdent de leur immunité contre une toxine, dès que la toxine cesse d'agir.

Expérience IV. — Complétons l'expérience précédente, mais au lieu de faire agir la levure en masse sur une solution de sucre fermentescible par elle, faisons-la macérer dans l'eau distillée ou en présence d'un sucre non fermentescible par elle, comme le lactose. Au bout de 8 jours on introduit sur cette levure une solution de galactose. Si celle-ci avait été préalablement acclimatée au galactose, la fermentation commence rapidement mais cesse bientôt, l'alcool produit devenant nuisible.

Une levure habituée au glucose s'acclimate très bien au galactose après cette macération, et est même moins sensible à l'influence de l'alcool que la levure préalablement habituée au galactose.

De cette expérience nous retenons ce fait qu'une levure acclimatée, restant dans l'eau sans addition de sucre, conserve la propriété d'attaquer au bout de 1 ou 2 heures le galactose

qu'on lui fournit. Quant à l'action funeste de l'alcool, elle peut tenir à des causes très variées dans l'étude desquelles nous ne pouvons entrer.

Il faut donc, pour que la levure perde son accoutumance, qu'on lui fournit un sucre fermentescible autre que le galactose.

En résumé, nous venons de voir et de démontrer qu'une levure dont le développement s'était effectué en l'absence de galactose éprouve pendant un certain temps une sorte de répulsion pour ce sucre avant de l'attaquer. Nous désignerons ce temps sous le nom de *période d'accoutumance*.

Une fois habituée au galactose, la levure possède la propriété de décomposer le glucose 1,6 fois plus vite que le galactose.

Cette accoutumance peut disparaître en partie quand un autre sucre est donné à fermenter à la levure ; mais, en laissant simplement la levure macérer dans l'eau, elle ne perd pas la faculté d'attaquer rapidement le galactose ; si elle est accoutumée, elle devient seulement plus sensible à l'action de l'alcool.

IV

INFLUENCE DE CERTAINES SUBSTANCES SUR L'ACCOUTUMANCE ET LA FERMENTATION DU GALACTOSE

Maintenant que nous savons qu'une période d'accoutumance existe chez toutes les levures non habituées au galactose, étudions l'influence possible, même probable, de diverses substances qui peuvent favoriser ou retarder le moment où la levure devient capable d'attaquer ce sucre. Ces substances peuvent être indifférentes pendant la période d'accoutumance, mais agir sur la fermentation du galactose et l'entraver.

Avant d'entrer dans l'étude de l'action de ces substances, je signalerai certains corps ou même certains facteurs qui sont indifférents soit sur l'accoutumance, soit sur la fermentation du galactose.

CAUSES INDIFFÉRENTES — Il demeure entendu qu'il n'existe aucune différence entre les levures hautes et les levures basses dans leur durée d'acclimatation au galactose. Cette durée est très variable, elle est de 3 heures pour une levure de lactose et de 72 heures pour certaines levures de bière.

Le milieu nutritif qui a servi au développement de la levure avant son introduction dans les tubes flambés est également indifférent. Ainsi je remplace l'eau de touraillons qui me servait comme milieu de culture par du liquide Raulin, du liquide Laurent, de l'eau de levure, des bouillons, etc., et les levures développées dans de tels milieux, mises en masse, se comportent exactement de la même manière quand on les fait agir sur une solution de galactose pur.

CAUSES QUI INFLUENT : *Influence de l'air.* — Elle n'est pas très sensible. Nous avons vu qu'une levure de lactose habituée au glucose pouvait attaquer le galactose au bout de 2 heures. Or, une condition est nécessaire pour obtenir ce résultat, c'est que la levure ait à sa disposition une certaine quantité d'oxygène. Si on remplace les matras de Bohème, qui nous ont servi comme ballons de culture, par un ballon permettant de faire une culture en profondeur, on constate que la durée d'accoutumance a considérablement augmenté, et atteint 8 et même 12 heures. En diminuant l'arrivée de l'air, on retarde l'acclimatation. Pour les autres levures, l'air semble être indifférent.

Influence de la concentration du sucre. — Dans les expériences rapportées précédemment, j'ai toujours fait développer mes levures dans des milieux contenant 20/0 de sucre. Cette concentration avait été choisie de telle sorte que la levure, au bout de 3 jours, ait fait disparaître tout le sucre. On eût pu, dans la majorité de nos expériences, opérer avec une concentration moitié moindre, mais il n'en est pas toujours ainsi.

Si nous ensemencons une levure de lactose dans des liquides où la concentration du sucre aille en décroissant, on constate que cette levure, mise en masse en présence de galactose, s'acclimate plus ou moins rapidement selon la concentration du liquide originel. Ainsi, en opérant avec de l'eau de touraillons renfermant 20/0, 10/0 et 0,50/0 de glucose, nous avons obtenu les résultats suivants :

Concentration du glucose.	Durée d'accoutumance.
2%	3 heures.
1%	8 heures.
0,5%	36 heures.

Plus il y avait de sucre originellement, plus la durée d'accou-

tumance est courte. Certaines levures de lactose qui semblaient faire un groupe à part, à cause de leur courte durée d'accoutumance, rentrent dans la catégorie des autres levures quand on diminue la concentration du sucre du milieu de culture.

Avant de passer à l'étude des substances qui influent soit sur l'accoutumance des levures au galactose, soit sur la fermentation de ce sucre, il faut ouvrir une parenthèse, nécessaire pour expliquer les modifications techniques qu'il a fallu apporter dans le but d'éviter de grossières erreurs.

Absorption du galactose par les levures. — Si on prend une levure en masse habituée seulement au glucose, par exemple, et qu'après l'avoir fait agir 12 heures sur une solution de galactose, on dose le sucre restant (aucun dégagement gazeux n'ayant eu lieu) on constate une disparition de sucre non accompagnée de gaz carbonique.

Voici en effet quelques résultats :

Levures.	Concentration du galactose.	Sucre restant.	Poids levure milligr.
Levure de vin N° 6.	6 %	5,29	230
Levure de bière Bass.	6 %	5,00	209
Distillerie Alfort.	6 %	5,09	290

Avec les levures inactives vis-à-vis du galactose, on trouve des résultats identiques :

S. Ludwigii,	6 %	5,20	540
S. Apiculatus.	6 %	5,20	360

Cette propriété semble spéciale au galactose. Avec les levures ne sécrétant pas de maltase ou de lactase, le maltose et le lactose introduits à la place de galactose se retrouvent intégralement dans les conditions de l'expérience précédente.

Les levures ne sont pas seules à produire ce phénomène. En diffusant simplement avec des dialyseurs ordinaires une solution contenant soit du galactose pur, soit un mélange de glucose et de galactose, on constate encore une absorption de galactose. La membrane dialysante était en parchemin animal. En analysant au bout de 4 heures les différentes proportions de galactose et de glucose dialysé, nous avons trouvé les résultats suivants :

Sucre introduit en milligr.		Sucre dialysé en milligr.		Sucre non dialysé en milligr.		Différence en milligr.
glucose.	galactose.	glucose.	galactose.	glucose.	galactose.	galactose.
154	0	68	0	86	0	0
102	48	45	15	57	27	8
51	97	22	31	28	54	16
0	145	0	45	0	77	25

La quantité de sucre manquant représente du galactose, et celle-ci croît proportionnellement à la concentration du sucre.

Pour désigner cette disparition de galactose, nous dirons que le galactose a été absorbé par la levure.

Cette absorption de galactose doit être consécutive d'une diffusion, car il suffit de tuer les levures en les portant à 100° pour empêcher ce fait de se produire.

Ces phénomènes d'absorption ont été déjà signalés par Graham, je ne les mentionne que pour expliquer les modifications que j'ai dû apporter aux procédés d'analyse. Une fois la levure acclimatée, le galactose absorbé disparaît.

Si nous nous étions contentés de doser le galactose restant après l'action d'une levure en présence d'un antisепtique, par exemple, nous aurions pu faire de grossières erreurs dues à l'absorption de galactose, qui aurait été compté comme sucre disparu par la fermentation. Nous nous sommes mis à l'abri de cette erreur en dosant l'acide carbonique résultant de la fermentation.

Substances empêchant toute accoutumance. — J'ai donc apporté à la technique suivie jusqu'ici quelques modifications que je vais indiquer. Biernacki, dans ses études classiques sur l'action des antisепtiques, a montré qu'elle dépend de leur poids et de leur concentration. Elle dépend en outre de la quantité de levure employée.

Il fallait donc trouver un moyen de sécher une levure tout en la conservant pure, et de la peser également sans l'infecter.

Dans un tube à essai assez large et préalablement flambé, j'introduis de l'acide sulfurique pur. D'autre part je prends un petit tube contenant de la *levure en masse* et pure. Ce tube flambé extérieurement est introduit rapidement dans le tube plus large



contenant SO_4^2H_2 , après avoir été débarrassé de son tampon de coton, de façon à accélérer la dessiccation de la levure. Les tubes ainsi préparés sont placés sous la cloche à vide à la température de 25°. Le temps de séchage dure 4 à 6 jours suivant la levure. Celle-ci sèche, on retire le petit tube au moyen d'une pince. On lui remet un bouchon flambé et on pèse le tube plein. Comme il avait été préalablement pesé vide, l'augmentation du poids représente le poids de la levure sèche.

Sur cette levure sèche on introduit 2 c. c. d'une solution de glucose ou de galactose avec l'antiseptique à étudier. On place ce petit tube dans un ballon à col assez long, on y fait le vide et on ferme le ballon à la lampe. On dose l'acide carbonique dégagé.

Influence de l'acide borique. — On sait que l'acide borique agit d'une façon toute particulière sur la levure en facilitant son dépôt. Son action n'est pas moins intéressante sur l'accoutumance des levures au galactose. Si on fait agir une *levure en masse* habituée au glucose sur une solution de galactosé additionnée de 0,66 0/0 d'acide borique, on ne constate aucun dégagement gazeux. La levure est dans l'impossibilité de s'accimuler à ce sucre. On obtient le même résultat si, au lieu d'employer une levure séchée, on employait une levure jeune.

Mais, à la place d'une solution de galactose, employons une solution de glucose. La fermentation se déclare aussi rapidement qu'en l'absence d'antiseptique. La dose d'acide borique employée n'était pas suffisante pour empêcher toute fermentation alcoolique du glucose, elle est largement suffisante pour ne pas permettre à une levure de s'accoutumer au galactose.

Pour bien montrer que l'acide borique n'agit pas en empêchant la fermentation du galactose, nous remplaçons notre levure habituée au glucose par la même espèce, habituée cette fois au galactose. L'acide borique, dans cette expérience, agit sur la fermentation du galactose comme sur celle du glucose, en diminuant légèrement à cette dose l'activité de la fermentation.

Avec une levure accoutumée au galactose, le rapport

$$R = \frac{\text{Vitesse fermentative du glucose}}{\text{Vitesse fermentative du galactose}}$$

est après 24 heures sensiblement égale encore à 1,6.

L'acide borique agit donc simplement sur la cellule non accimulée, empêchant l'accoutumance de se produire.

Pour toutes nos levures, l'acide borique s'est comporté de cette façon.

L'existence des levures inactives vis-à-vis du galactose tient, peut-être, à la présence dans leur intérieur d'une substance agissant à la manière de l'acide borique, et cet antiseptique nous permet de faire passer, dans la catégorie des levures inactives, une levure réputée active vis-à-vis du galactose.

La présence de glucose n'empêche pas l'action de l'acide borique sur l'accoutumance. En faisant fermenter un mélange de glucose et de galactose en présence d'acide borique avec de la levure en masse habituée au glucose¹, on retrouve inattaqué le galactose introduit.

Si, au bout de 24 heures, le rapport $R = 1,6$, il ne faut pas croire qu'il en sera toujours ainsi. Si on note la durée du dégagement gazeux, on trouve les résultats suivants :

	Sucre introduit 440 milligr.	Durée de la fermentation.	Poids levure milligr.
Levure acclimatée au galactose.	+ 2 c.c. glucose.	3 jours.	65
	+ 2 c.c. galactose.	6 jours.	82
	+ 2 c.c. glucose + 0 gr. 02 BoO ³	5 jours.	65
	+ 2 c.c. galactose + 0,02	— 6 jours.	102
	+ 2 c.c. glucose + 0,04	— 4 jours.	73
	+ 2 c.c. galactose + 0,04	— 10 jours.	77

On peut remarquer la durée assez longue de la fermentation du galactose en présence de 0 gr. 04 de BoO³. Ce résultat tient à l'influence de l'alcool combinée avec celle de ce corps.

En résumé, l'acide borique agit sur les levures non habituées au galactose et empêche toute accoutumance.

Son action sur la fermentation du galactose est comparable à celle sur la fermentation du glucose.

Influence du toluène. — Le toluène comme l'acide borique empêche l'accoutumance au galactose. Les levures de lactose habituées au glucose font exception à cette règle générale. En étudiant l'influence de l'acide borique, nous avons laissé de côté ces levures parce que leurs cellules sont très sensibles à l'action de ce corps aux doses que nous employions.

Les levures de lactose habituées au glucose sont en partie accoutumées naturellement au galactose : aussi s'explique-t-on la non-influence du toluène sur elles.

1. Les levures habituées au lévulose, maltose et saccharose se comportent comme les levures habituées au glucose.

Le toluène possède le désavantage d'être peu soluble dans l'eau; nous avons été obligé, dans l'impossibilité de varier les doses, d'opérer dans des conditions telles que le liquide sucré en était saturé. Dans nos tubes renfermant les *levures en masse*, on ajoute le liquide sucré et une épaisseur de 4 cm. de toluène, de façon à maintenir l'eau saturée, ce corps étant assez volatil.

Aussitôt que l'antiseptique a disparu, les levures non acclimatées s'accoutumant au galactose, sauf dans quelques cas particuliers que nous rencontrerons plus loin.

Mais entre l'action du toluène et celle de l'acide borique existe une différence. Avec ce dernier, 100 mg. de levure font disparaître facilement 400 mg. de galactose dissous dans 2 c. c. de liquide. Avec le toluène, le dégagement gazeux cesse 12 à 24 heures après le commencement de la fermentation. La proportion de sucre fermenté est à peu près de 2 0/0. Voici quelques résultats obtenus avec une levure accoutumée au galactose et additionnée soit de glucose, soit de galactose.

	Sucre fermenté 0/0	Poids de levure en mill.
Levure de vin mise en présence de 2 c. c. Sol. glucose + 1 c. c. toluène.	1,7	53
— galactose + —	1,6	50
Lev. de distillerie — — — glucose + —	1,52	33
— — — galactose + —	1,91	30

Le toluène agit sur l'acclimatation et aussi sur la fermentation alcoolique, et avec la même énergie, quelle que soit la nature du sucre décomposé.

Cette action du toluène est due à l'influence de ce corps augmentée de celle de l'alcool.

Il suffit d'ajouter des solutions sucrées additionnées de 1 0/0 d'alcool avec le toluène pour ne pas constater de fermentation. Le protoplasma de la cellule est atteint, car en faisant macérer une levure dans l'eau additionnée de 1 0/0 d'alcool et de 1 c. c. de toluène, on constate après 4 jours que la levure est morte. Au microscope, la levure laisse voir un protoplasma très granuleux.

Le toluène seul exerce déjà une certaine action sur les levures. Si l'on prend une levure acclimatée ou non au galactose, et qu'on la fasse macérer dans l'eau additionnée de toluène pendant 8 jours à 25°, on constate un retard dans l'apparition

du dégagement gazeux, quand on fait agir de la levure sur le galactose ou un autre sucre.

Voici pour une levure ce qu'on trouve:

	Dégagement gazeux manifeste au bout de :	Poids de levure en millig.
Levure acclimatée mise en présence de :	2 c. c. Sol. glucose 10% + 0 c. c. 2 toluène. — galactose 10% + —	2 heures 72 2 heures 70
Levure non acclimatée mise en présence de :	2 c. c. Sol. glucose 10% + 0 c. c. 2 toluène. — galactose 10% + — — glucose..... — galactose.....	6 heures 84 3 jours 100 2 heures 88 2 jours 80

Dans toutes ces expériences, la levure non acclimatée semble plus sensible à l'action du toluène que la levure acclimatée.

L'action combinée de toluène et d'alcool est, comme dans les expériences de Biernacki, plus forte que celle résultant de la somme des actions réciproques de ces deux corps.

Quand on cultive les levures dans des milieux riches en peptone, l'influence du toluène se fait beaucoup plus sentir.

Nous mettons *en masse*, dans des tubes, une levure provenant d'une culture dans l'eau de touraillons additionnée de 1 0/0 de peptone, et on ajoute dans chacun une solution de toluène dans l'eau. Au bout de 4 jours le toluène est évaporé, on ajoute alors une solution de galactose et on constate ceci. Dans les tubes qui renferment la levure acclimatée, un dégagement gazeux commence après 24 heures, tandis que les levures non acclimatées, soumises à ce traitement, sont devenues incapables de s'acclimater. La levure est cependant vivante : il suffit de la transporter dans un milieu nutritif sucré pour qu'elle se développe facilement.

Repronons les tubes contenant une *levure en masse* acclimatée au glucose en présence de peptone, mais au lieu de la faire agir sur une solution de galactose, nous introduisons dans le tube une solution de glucose avec 0,2 c.c. de toluène. On ne constate de fermentation qu'après la disparition du toluène. La levure n'était pas morte, et il y a lieu de penser que, pendant la macération dans l'eau additionnée de toluène, celle-ci a perdu sa zymase détruite par ce traitement.

La levure non accoutumée, traitée comme nous venons de l'indiquer, et transportée dans l'eau de touraillons additionnée de galactose, ne peut se développer ni faire fermenter ce sucre.

Voici donc une levure qu'une simple macération dans l'eau additionnée de toluène rend inactive vis-à-vis du galactose.

Pour lui rendre son activité, il suffit d'ajouter une trace de glucose qui, redonnant la jeunesse aux cellules, les met dans les conditions nécessaires pour s'accoutumer au galactose.

Les levures accoutumées soumises au toluène peuvent très bien se développer dans l'eau de touraillons galactosée. Il semble même que, dans ces conditions, la zymase de ces levures résiste bien mieux que celle des levures non accoutumées.

Comme ces phénomènes d'acclimatation sont assez généraux, nous pouvons rechercher des rapprochements chez les microbes avec les faits que nous constatons.

Ainsi cette action du toluène sur la zymase d'une levure peut être rapprochée, à mon avis, de ce qui se passe chez un microbe très virulent. Ce microbe, placé primitivement dans des conditions très favorables, se développe, mais son activité passe par un maximum. Au bout d'un certain temps les conditions deviennent défectueuses et les cellules résistent d'autant moins que l'activité avait été plus grande : le microbe perd de sa virulence. Pour la récupérer il lui faut des conditions spéciales, comme dans notre expérience la présence du glucose est nécessaire à la levure.

Mais où l'embarras commence, c'est quand on veut fournir une explication satisfaisante des résultats obtenus. On pourrait dire, par exemple, en admettant avec Buchner que l'action des diastases protéolytiques détruit la zymase, que la peptone a favorisé la sécrétion de ces diastases, et qu'en présence de toluène ces diastases protéolytiques ont continué à agir, peut-être ont augmenté d'activité et ont détruit la zymase. Cette explication ne repose sur aucun fait bien précis. La vérification est difficile, et les expériences que j'ai entreprises dans cet ordre d'idées ont toujours abouti à des résultats négatifs. Je veux bien que ces insuccès n'infirment rien, les diastases protéolytiques agissantes pouvant ne pas diffuser.

On peut donner une autre explication, qui ne nous renseigne pas davantage sur le mécanisme de la destruction de la zymase, mais qui repose sur une observation dont la généralité semble s'étendre sur beaucoup de cellules. Toutes les fois qu'on augmente outre mesure l'activité d'une cellule, il se produit bientôt une réac-

tion inverse qui tend à affaiblir cette cellule rendue précédemment trop active. Ce fait semble général même pour les cellules des organismes. Quand on fournit des excitants à des animaux, après l'excitation survient l'abattement. Si à ce moment une cause nuisible survient, l'action nuisible se trouvera augmentée par suite de l'affaiblissement de la cellule. C'est ce qui arrive aux levures développées en présence de peptone et sur lesquelles le toluène a ensuite agi. Du reste, toute cause capable d'augmenter l'activité d'une cellule doit être suivie d'un affaiblissement. Ainsi, le phosphate d'AzH³ remplaçant la peptone dans le milieu de culture fournit des levures sensibles à l'action du toluène, mais moins sensibles que dans le cas de la peptone.

Une levure habituée au glucose, agissant sur un mélange de glucose et de galactose additionné de toluène, ne fait pas fermenter le glucose seul. Le même résultat est obtenu avec une levure acclimatée au galactose. Pour expliquer ce fait qui semble anormal, nous ferons remarquer que le glucose fermente plus vite que le galactose. Or les petites quantités d'alcool produites au commencement suffisent pour modifier l'intérieur du protoplasma et rendre difficile la diffusion du galactose. En faveur de cette hypothèse, je citerai l'expérience suivante : Sur une levure acclimatée je mets 5 c. c. d'une solution de glucose à 10 0/0 et, la fermentation terminée, je soutire le liquide fermenté et lave la levure à l'eau distillée. J'introduis sur la levure, à la suite de ce lavage, une solution de galactose avec un excès de toluène ; dans un autre tube traité de la même manière j'introduis une solution de glucose avec également un excès de toluène. Je dose l'acide carbonique dégagé et j'obtiens les résultats suivants :

CO ₂ dégagé à 0° et à 760° %		
Tube renfermant solution de glucose.....	4 c. c.	7
— — galactose.....	0 c. c.	8

Cette différence ne peut guère s'expliquer que par la difficulté de la diffusion du galactose dans un protoplasma ainsi vieilli.

En résumé, le toluène, comme l'acide borique, empêche l'accoutumance des levures, mais son action s'exerce également sur la zymase, dont il facilite la destruction, surtout si la levure

n'est pas acclimatée, et dans des conditions spéciales définies dans ce paragraphe.

Son action s'exerce encore sur le protoplasma quand il est mélangé à l'alcool. La mort de la cellule survient alors très rapidement.

SUBSTANCES AGISSANT SUR LA FERMENTATION DU GALACTOSE. — Étudions maintenant certains corps qui sont sans influence sur l'acclimatation des cellules, mais dont l'action peut être plus nuisible dans le cas d'une fermentation de galactose que dans celui d'une fermentation de glucose. Parmi celles-ci, je citerai pour commencer les acides.

Influence de l'acide malique. — Je cite le cas de l'acide malique, ayant déjà parlé au chapitre II de l'influence de l'acide tartrique.

Si on fait agir une *levure en masse*, accoutumée ou non au galactose, sur une solution de galactose ou de glucose, additionnée d'acide malique, on constate au bout d'un temps plus ou moins long, suivant que la levure est ou non acclimatée, un dégagement gazeux, qui cesse assez vite quand la levure agit sur le galactose.

Voici en effet quelques chiffres :

Liquide introduit dans chaque tube contenant 70 milligrammes de levure non acclimatée.	Sucre fermenté en milligr.
2 c. c. Solution de glucose à 12 %.....	240
— — — de galactose à 13,2 %.....	264
— — — de glucose + 1 c. c. Sol. acide malique à 2,75 %	240
— — — de galactose + — — — —	204
— — — de glucose + — — — —	5,5 % 240
— — — de galactose + — — — —	101
— — — de glucose + — — — —	11,0 % 240
— — — de galactose + — — — —	29

L'action de l'acide malique est indépendante du poids de levure employé. Ainsi, au lieu de 70 milligrammes, nous faisons agir 7 milligrammes seulement de levure additionnée d'acide malique. Nous trouvons comme sucre fermenté :

La levure reçoit.	Sucre fermenté en milligr.
2 c. c. Sol. de glucose à 18 % + 1 c. c. Sol. acide malique à 2,75 %	366
— — — de galactose à 21 % + — — — —	366
— — — de glucose à 18 % + — — — —	5,5 % 360
— — — de galactose à 21 % + — — — —	267

4. Pour obtenir une petite quantité de levure, nous opérons ainsi : On introduit 10 c. c. d'eau de touraillons sucrée dans un tube à essai. On ensemence et, la fermentation terminée, on soutire le liquide fermenté en laissant la levure au fond du tube.

L'influence de la nature du milieu originel se fait également sentir ici. Ainsi l'action de l'acide malique sur la fermentation du galactose est plus faible quand la levure s'est développée dans un milieu riche en peptone ou en phosphate d'AzH³.

Avec la même levure dont j'ai rapporté les résultats à la page précédente on trouve :

Levure cultivée dans l'eau de touraillons peptone 2 % additionnée de :	Sucre fermenté en milligr.
2 c. c. glucose 18 % + 1 c. c. acide malique à 5,5 %	360
— galactose 21 % + — — —	378
Levure cultivée dans l'eau de touraillons phosphate d'AzH ³ 2 % additionnée de :	Sucre fermenté en milligr.
2 c. c. glucose 18 % + 1 c. c. acide malique à 5,5 %	360
— galactose 21 % + — — —	298

Enfin nous ajouterais pour finir que le rapport

$$R = \frac{\text{vitesse fermentation du glucose}}{\text{vitesse fermentation du galactose}}$$

varie entre 1,5 à 1,7, après 24 heures de fermentation. Nous voyons encore ici que ce nombre varie peu.

En résumé, l'acide malique n'empêche pas l'accoutumance des levures au galactose, mais exerce son action sur la fermentation du galactose, action bien moins sensible quand on remplace ce sucre par du glucose.

Influence de l'alcool. — L'action de ce corps ressemble beaucoup à l'action des acides; ce n'est que par le détail que leurs actions diffèrent. Pour l'alcool le poids de levure intervient.

Déjà, au chapitre II, nous avons vu qu'une levure décomposait moins de galactose que de glucose. Cet arrêt tenait déjà à l'influence de l'alcool. Ajoutons dans des tubes, contenant 7 milligrammes environ de levure, 5 c. c. d'une solution de glucose ou de galactose additionnée de doses variables d'alcool, de façon à obtenir des concentrations de 4,4 0/0, 8,3 0/0, 13 0/0 en volume.

Avec une levure accoutumée nous avons obtenu les résultats suivants :

Chaque tube reçoit	Sucre fermenté %
5 c. c. de glucose à 45,01 % + 4,4 % alcool.	15,01
— de galactose à 18,59 % + — — —	7,52
— de glucose à 45,01 % + 8,3 % — —	15,01
— de galactose à 18,59 % + — — —	4,47
— de glucose à 45,01 % + 13,0 % — —	11,41
— de galactose à 18,59 % + — — —	1,30

L'alcool n'influe pas sur l'acclimatation, mais exerce une action nuisible sur la fermentation du galactose.

Son action dans ce cas pourrait tenir à une coagulation du protoplasma des cellules. Or il n'en est rien, et il semble bien que dans ces conditions l'influence de l'alcool se fasse seulement sentir sur la zymase. Si dans chaque tube ayant fait fermenter une certaine quantité de galactose on ajoute une solution de glucose additionnée d'une dose suffisante d'alcool, de façon à ne pas changer le degré alcoolique du liquide de chaque tube, on obtient une fermentation, le galactose restant inaltéré.

L'action de l'alcool sur la zymase semble comparable à l'action du maltose sur l'amylase.

L'intérieur du protoplasma était, bien entendu, très granuleux et, dans ces conditions, le galactose diffuse mal.

Cette condition serait insuffisante pour expliquer l'arrêt de la fermentation du galactose, car en augmentant la dose de levure, l'influence de l'alcool diminue.

Si, en effet, on opère avec une *levure en masse*, et qu'on fasse agir celle-ci sur une solution de glucose ou de galactose additionnée d'alcool de façon à obtenir une concentration alcoolique de 10 0/0 et 15 0/0 d'alcool, on trouve que la fermentation s'arrête pour les deux sucres quand la dose d'alcool est identique dans les deux cas.

Voici en effet les quelques résultats obtenus :

La levure reçoit	Temps mort.	Sucre fermenté %	Poids levure milligr.
2 c. c. Solution de glucose à 16,45 %	2 h.	16,45	65
— — de galactose à 13,41 %	2 h.	13,41	82
— — de glucose à 16,41 %	3 h.	16,45	84
— — de galactose à 13,41 %	3 h.	13,41	85
— — de glucose à 16,45 %	8 h.	7,93	125
— — de galactose à 13,41 %	8 h.	8,40	120

Il est naturel d'admettre que l'alcool exerce son action coagulante sur le protoplasma des cellules quand sa concentration atteint un certain degré, et indépendamment du poids de levure en présence, que par conséquent on ne peut attribuer à un défaut de diffusion l'arrêt de la fermentation du galactose quand, avec une dose moindre de levure, la fermentation du galactose est arrêtée pour un degré moindre d'alcool.

Si on fait agir la levure en masse aussitôt l'arrêt de la

fermentation obtenu, aucun autre sucre ne peut être décomposé par la levure. Même en évaporant l'alcool, la fermentation continue difficilement, ce qui indique une modification intérieure de la cellule.

En résumé, l'alcool agit de deux façons : sur la zymase quand il y a peu de cellules, et sur le protoplasma quand la quantité de levure est en grand excès.

Action de quelques autres corps. — Pour terminer je dirai quelques mots de deux antiseptiques puissants : le sublimé ($HgCl_2$) et l'acide phénique (C_6H_6O).

Le sublimé à faible dose est un antiseptique puissant. Empêche-t-il l'acclimatation au galactose ? En opérant avec la *levure en masse*, j'ai pu me convaincre que non, et avec une levure non accoutumée la quantité de sucre était la même, que ce soit du glucose ou du galactose.

Voici quelques résultats :

Les tubes reçoivent.	Sucre fermenté %	Poids levure en milligr.
2 c. c. Sol. glucose à 22 % + 0,003 $HgCl_2$.	22,00	62
— galactose à 13,41 % + —	13,41	55
— glucose à 22 % + 0,006 —	2,38	48
— galactose à 13,41 % + —	2,13	57

L'acide phénique agit un peu de la même manière. Il n'entrave pas l'accoutumance.

Il est donc intéressant de faire remarquer qu'un antiseptique puissant, pouvant arrêter rapidement la fermentation et le développement des cellules, peut agir, à dose légèrement au-dessous de la dose antiseptique, avec moins d'énergie pendant le travail d'acclimatation que d'autres corps tels que l'acide borique, bien moins antiseptiques que les précédents.

Il n'y a donc aucune relation entre la puissance antiseptique et la *puissance antiacclimatante*, si on peut s'exprimer ainsi, c'est-à-dire la quantité de substance nécessaire pour empêcher l'acclimatation.

Cette observation peut avoir une certaine importance partout où se manifestent des phénomènes d'accoutumance. Ainsi, dans la lutte contre les microbes, les phagocytes doivent s'accoutumer à leurs toxines. Il peut se trouver quelques substances dans le sang qui retardent et même entravent l'acclimatation des leuco-

cytes, comme il peut se faire que l'emploi de certains antiseptiques, sans influence sur l'accoutumance aux toxines, empêche le développement du microbe, arrêtant ainsi la sécrétion de la toxine. C'est à un phénomène du même ordre qu'on peut attribuer l'action du chlorure d'iode dans la production du sérum. Peut-être trouverait-on dans cette voie un auxiliaire des sérum.

En résumé, nous avons vu dans ce chapitre que l'on pouvait classer les antiseptiques, dans le cas qui nous occupe, en quatre catégories :

1^o Corps qui n'agissent que sur l'accoutumance (l'acide borique);

2^o Corps qui, comme le toluène, empêchent l'acclimatation et entravent la fermentation du galactose comme du glucose;

3^o Corps qui, comme l'alcool, les acides, entravent la fermentation du galactose et sont, pour ainsi dire, sans influence sur celle du glucose;

4^o Corps qui, sans entraver l'accoutumance, arrêtent rapidement la fermentation alcoolique de n'importe quel sucre (sublimé, phénol, alcool sur levure en masse).

L'acclimatation d'une levure est donc le résultat d'un phénomène qui nous apparaît comme compliqué, et comme elle est empêchée par certaines substances qui n'arrêtent pas la fermentation, on pourrait croire que le travail qui s'accomplit dans l'intérieur des cellules se produit seulement dans une portion spéciale de la cellule ayant ses exigences propres.

V

LEVURES ACTIVES ET LEVURES INACTIVES¹

Jusqu'à présent nous avons laissé de côté les levures inactives ; le moment est venu de rechercher les relations qui les unissent aux levures actives.

Les travaux de Buchner sur la zymase alcoolique rendaient inexplicable l'existence de levures inactives, et l'idée vint de croire à l'existence de plusieurs zymases. Les levures actives

1. Afin d'abréger je désignerai sous le nom de levures actives celles qui décomposent le galactose en alcool et CO_2 et inactives celles qui dans les conditions ordinaires ne décomposent pas ce sucre.

seraient aux levures inactives en présence du galactose comme les levures de lactose sont aux levures de bière inactives vis-à-vis du lactose.

Dans diverses circonstances que nous allons préciser, il est possible de transformer une levure active en une levure inactive. La réciproque est vraie d'après les expériences de M. Dubourg.

Préparons d'abord un milieu de culture très nutritif pour les levures, mais exempt le plus possible de substances hydrocarbonées qui permettent à la levure de se développer dans un tel milieu non sucré. Si on prend l'eau de touraillons, il est bon de transformer les traces d'amidon qu'elle contient en glucose au moyen d'acide acétique; on chasse ensuite cet acide en partie par évaporation. Après ce traitement on ajoute du glucose, de façon à obtenir une concentration de 0,5 0/0 de sucre, et on ensemence avec une levure active.

On se sert de ballons très larges de manière à produire une combustion à peu près complète des substances hydrocarbonées pouvant servir au développement de la levure.

On filtre le liquide au bout de 8 jours; lorsque la fermentation est terminée, on évapore au bain-marie pour chasser les acides volatils, l'alcool, ainsi qu'une partie de la glycérine.

L'extrait obtenu, redissous dans l'eau distillée, servira de milieu nutritif quand on l'additionnera de sucre.

Additionnons un tel milieu de galactose et ensemencons avec une levure active. Si l'opération a été bien faite, le galactose est absolument inattaqué par la levure, qui ne se développe pas ou d'une façon très minime. Or, avec les levures actives, nous avons déjà obtenu des résultats semblables. Il suffit de les cultiver dans un milieu riche en peptone, et, après développement, de les faire macérer en présence du toluène, ainsi que nous l'avons déjà vu au chapitre précédent. Cette comparaison ne doit pas être poussée trop loin, car nous comparons une levure jeune inactive avec une levure vieille rendue inactive par l'action du toluène. Ce sont les conditions de rajeunissement qui ne se trouvent pas dans ce milieu et qu'une trace de glucose modifie très heureusement.

Pour établir une relation plus étroite entre les levures actives et les levures inactives, employons un milieu minéral, le liquide Laurent par exemple. Certaines levures actives

se développent bien dans le milieu minéral glucosé, et non quand il est additionné de galactose. Or, les levures inactives se comportent de la même façon. Il suffit d'ajouter à ce milieu de la peptone pour obtenir une fermentation du galactose avec les levures actives.

Réciproquement une levure inactive peut être rendue active. M. Dubourg a récemment résolu ce problème en cultivant une levure inactive dans un milieu riche en azote (eau de levure à 25 0/0) additionné d'un mélange de glucose et de galactose. La levure se multiplie, fait fermenter le glucose et s'acclimate en partie au galactose.

Je dis en partie, car, en répétant dans les mêmes conditions son expérience, j'ai trouvé que la disparition du galactose dans le milieu de culture n'était pas considérable. Une telle levure *mise en masse* dans un tube et additionnée d'une solution de galactose pur ne fait guère disparaître que 2 à 3 0/0 de sucre, quantité sensible, car elle a été calculée au moyen de l'acide carbonique dégagé, mais qui indique pour la fermentation du galactose une certaine sensibilité de ces levures à l'alcool. Cette même *levure en masse*, additionnée d'une solution de glucose à 18 0/0, décompose tout ce sucre. D'après ce que nous avons vu au chapitre précédent, la quantité d'alcool eût été à peu près la même dans ces deux fermentations, si la levure avait été entièrement acclimatée au galactose.

En résumé, toutes les levures pouvant faire fermenter le glucose décomposent le galactose; mais, au point de vue de l'acclimatation, toutes les levures ont des exigences variées. Les levures inactives à ce point de vue sont les plus exigeantes.

Nous avons vu au chapitre I que l'addition de peptone diminue la sensibilité des levures à l'alcool. Or ces levures inactives nous apparaissent comme très sensibles à l'action de ce corps : aussi comprend-on fort bien l'influence de l'azote dans les expériences de M. Dubourg.

Reste à expliquer le rôle que joue le glucose dans les expériences de M. Dubourg. Le glucose est un sucre facilement assimilable par les levures, ainsi que je l'ai signalé au chapitre précédent. Par ce fait, il favorise le rajeunissement des levures.

Or, une levure rajeunie et en voie de multiplication s'acclimate facilement au galactose. L'influence d'une trace de glucose

pour rendre active une levure rendue inactive par le toluène ne peut s'expliquer qu'ainsi. Le protoplasma chez les levures inactives vieillit peut-être très rapidement; la présence du glucose est donc nécessaire pour maintenir pendant un certain temps les cellules dans un état satisfaisant de jeunesse. Nous verrons même au chapitre suivant qu'une certaine quantité de glucose peut favoriser l'accoutumance des levurés.

Ceci explique encore les résultats des expériences de M. Bourquelot. En faisant agir une levure de commerce forcément vieille sur du galactose impur, le glucose présent permettait aux cellules de se rajeunir et de s'accoutumer facilement au galactose.

Le milieu nutritif qui remplace le glucose dans les expériences de MM. Tollens et Stone facilite également le bourgeonnement des cellules.

Le rapport $R = \frac{\text{vitesse de fermentation du glucose}}{\text{vitesse de fermentation du galactose}}$, que nous avons mesuré en répétant les expériences de M. Dubourg, a été trouvé égal à 6 au lieu de 1,6, ce qui nous permet de dire que ces levures ne sont que partiellement acclimatées au galactose.

Cette constatation résulte également de ce fait qu'une telle levure, rendue active d'après le procédé de M. Dubourg et ensemencée dans un milieu nutritif additionné seulement de galactose, ne se multiplie presque pas. En résumé, théoriquement, il n'y a pas de levures inactives.

Pratiquement, au moyen de nos milieux de culture nous pouvons faire cette séparation; aussi peut-on accepter et conserver encore cette distinction.

Mais on doit rejeter la notion de fermentation par entraînement de M. Bourquelot, car nous connaissons maintenant le rôle du glucose dans l'acclimatation de levures au glucose dans ses expériences, et nous savons que son action n'est pas celle que pensait M. Bourquelot.

VI

MÉLANGE DE DEUX SUCRES ET ACCLIMATATION

Comme nous connaissons maintenant l'influence plutôt favorable du glucose, recherchons si une levure active, cultivée en

présence d'un mélange de glucose et de galactose, est capable de s'accoutumer rapidement à ce dernier sucre.

L'intérêt qu'il y avait à résoudre cette question était de deux sortes. Au point de vue accoutumance, il permettait de se rendre compte de l'influence possible d'un sucre concurrent du galactose, influence nuisible ou utile. Au point de vue philosophique, nous désirions savoir si une cellule peut, comme les êtres supérieurs, faire preuve de prévoyance pour l'avenir en s'acclimatant rapidement afin de pas éprouver d'arrêt dans son alimentation.

Je ne rapporterai que quelques expériences suffisantes pour montrer les résultats auxquels je suis arrivé.

Mais, avant d'entrer dans la solution même du problème, nous devons établir une remarque importante qui nous permettra d'interpréter facilement et utilement les résultats trouvés.

Dumas, dans ses études sur la fermentation alcoolique, avait montré que la durée d'une fermentation était proportionnelle à la quantité de sucre dissous dans le liquide, et à peu près indépendante de la concentration de ce corps.

Les expériences de Dumas, reprises par Brown et plus récemment par J. O'Sullivan, furent confirmées par ces deux savants. Le principe de la proportionnalité de la durée de la fermentation à la quantité de sucre dissous sera désigné sous le nom de *principe de Dumas* afin d'abréger le langage.

Dans leurs expériences ces savants employaient de la levure toute développée, et la faisaient agir sur des liquides de concentrations différentes.

En opérant avec une trace de levure, et en l'ensemencant dans des milieux nutritifs, on obtient des résultats conformes au *principe de Dumas*, à la condition d'observer la précaution suivante. Une levure en se développant tend à occuper à peu près tout le fond du vase, puis fait fermenter le sucre. Or, pour que le commencement de la fermentation se fasse exactement ou à peu près au même moment dans tous les ballons, il faut que les fonds de ceux-ci soient à peu près identiques.

Voici quelques expériences qui permettent de se rendre compte de l'exactitude du principe de Dumas dans notre cas particulier.

Expérience I. — 20 c. c. d'eau de touraillons additionnée de :

Ballon A	40 % de glucose.
— B	7,5 % —
— C	5,0 % —

sont ensemencés avec une levure pure.

On dose au bout de 48 heures le sucre restant dans chaque ballon et on trouve comme sucre disparu :

Balloons	Sucre disparu %
— A	4,62
— B	5,04
— C	4,67

Quantité à peu près identique pour chaque ballon.

Expérience II. — La même expérience répétée avec des solutions de galactose fournit des résultats semblables :

Balloons	Galactose introduit %	Galactose fermenté %
— A	8,70	4,40
— B	5,80	4,15
— C	2,89	4,18

Expérience III. — On peut faire agir une levure sur un mélange de deux sucres dont l'un est fermentescible et l'autre non attaqué par la levure. Ici encore le *principe de Dumas* se vérifie.

Voici une expérience faite avec le *S. Ludwigi*.

0/0 de sucre introduit dans chaque ballon.	0/0 sucre fermenté après 40 h.
—	—
8,65 % de glucose.....	2,76
5,77 % —	2,92
2,88 % —	2,58
2,88 — + 5,0 % maltose	2,50
3,77 — + 2,50 —	2,84
2,88 — + 7,50 galactose	2,58
5,77 — + 3,94 —	2,55
2,88 — + 5,62 lactose	2,58
5,77 — + 2,81 —	2,94

Expérience IV. — Mais, pour vérifier le *principe de Dumas*, il faut un milieu nutritif pour la levure employée.

Avec un milieu aussi médiocre qu'un milieu minéral, ce principe ne se vérifie plus. Ainsi le liquide Laurent additionné de glucose à différents degrés de concentration fournit les résultats suivants :

Sucre introduit %	Sucre fermenté % après 40 heures.
10 % de glucose.	3,50
7,5 —	2,60
5,0 —	2,10

On peut fournir une explication de cette exception. Quand un milieu est très nutritif, l'addition de glucose à différents degrés de concentration n'augmente pas son caractère nutritif. Au contraire, un milieu médiocre se bonifie par l'addition de doses plus élevées de sucre, et dans de tels milieux la levure acquiert une activité plus grande que dans les mêmes milieux moins riches en sucre.

J'ajouterai qu'en opérant avec la zymase de Buchner, on obtient des résultats conformes au *principe de Dumas*.

Fermentation de deux sucres. — Pour étudier, à différentes époques de la fermentation, les quantités de deux sucres disparues, je me suis servi des deux méthodes usuelles. La première consistait à faire des prises à différents moments de la fermentation dans un même ballon; la deuxième revenait à analyser à divers intervalles une série de ballons semblables. Les deux méthodes sont également bonnes.

Dans les expériences que je vais rapporter, j'éviterai de citer les poids de levure. Les quelques chiffres qui suivent suffisent pour montrer que tous les ballons contiennent un poids à peu près constant de levure.

Eau de touraillons contenant		Poids de levure en milligr.	
Glucose %	Galactose %	Levure de Bruxelles.	Levure de lactose.
—	—	—	—
9,45	0	72	55
4,87	2,96	77	56
0,65	5,92	69	57

Je me suis servi de galactose pur du commerce contenant 10 0/0 de glucose. Ce dernier sucre favorise le développement de la levure et permet de récolter le même poids de levure que dans les autres ballons. Avec le galactose pur, le poids de levure serait plus élevé, ce qui rendrait le ballon non comparable avec les autres.

Expérience I. — Préparons une série de ballons contenant de l'eau de touraillons additionnée de différentes doses de galac-

tose avec un autre sucre, par exemple du glucose. Dans notre expérience les ballons contenaient :

N ^o s d e s Ballons.	Sucre introduit		Sucre t o t a l.
	Glucose %	Galactose %	
1	10,44	0	10,44
2	8,23	2,26	10,49
3	5,82	4,52	10,34
4	3,41	6,78	10,19
5	1,00	9,04	10,04

La concentration du sucre était voisine de 10 0/0 dans chaque ballon. 24 heures après l'ensemencement, nous dosons le glucose et le galactose restant comme il a été indiqué au chapitre I^{er}.

Nous trouvons :

N ^o s des Ballons	Sucre fermenté %	
	Glucose	Galactose
1	3,82	0
2	3,66	0,04
3	2,67	0,70
4	1,89	1,45
5	1,00	0,21

Traduisons ces résultats au moyen d'une courbe en portant en abscisses les proportions de sucre introduit dans chaque ballon et en ordonnées les quantités de sucre fermenté. (Fig. 1.)

On constate que la courbe représentant la quantité de galactose fermenté passe par un maximum quand, dans notre expérience, les quantités de galactose et de glucose introduites sont dans le rapport de 2 à 1. Mais nous voyons encore que la levure a pu s'accoutumer au galactose en présence du glucose. Cette levure, dans ces conditions, a donc manifesté des signes de prévoyance, et le glucose semble favoriser un peu l'accoutumance dans le ballon 4.

Le moment est venu d'appliquer ici le *principe de Dumas* à nos résultats. Nous rappellerons que dans le *principe de Dumas* on n'envisage que des sucres fermentant avec la même vitesse. Or le glucose fermente 1,6 fois plus vite que le galactose chez une levure acclimatée, et si nous voulons appliquer à la fermentation de ces deux sucres le *principe de Dumas*, il faut considérer que le galactose fermente aussi vite que le glucose. Si cela était, les quantités de galactose fermenté que nous trouverions

seraient 1,6 fois plus fortes que celles trouvées en réalité. Il faut donc multiplier par 1,6 les quantités de galactose fermenté que nous trouvons dans nos expériences, pour pouvoir appliquer le principe de Dumas.

Faisons donc la somme glucose fermenté + galactose fermenté $\times 1,6 = \Sigma$; nous trouvons en portant ces valeurs en abscisses une courbe représentée en traits interrompus qui monte rapidement pour devenir horizontale dans la majorité des ballons. Ce résultat nous indique que dans le ballon 3 la levure n'a pas eu

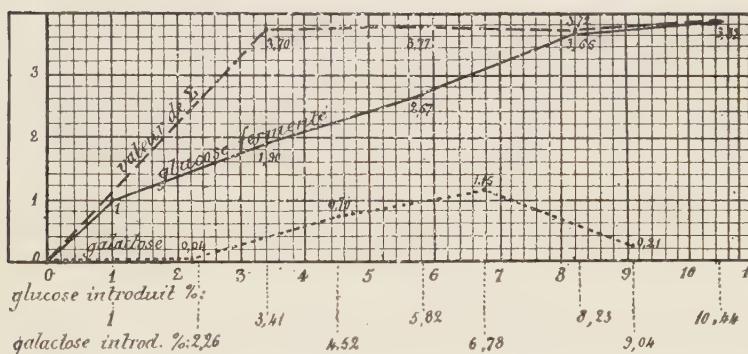


Fig. 1.

encore le temps suffisant pour s'accoutumer, tandis que dans les autres ballons la levure a pu s'accoutumer et faire fermenter le glucose et le galactose en proportions inégales, mais dont la somme Σ est à peu près constante pour tous les ballons.

Mais 48 heures après, en analysant le sucre restant, on trouve :

Nos d e s Ballons.	Sucre fermenté %	
	Glucose.	Galactose.
1	8,92	0
2	7,73	0,63
3	5,41	4,28
4	3,21	2,38
5	4,00	3,09

Les courbes obtenues avec ces résultats n'offrent plus de maximum, et la courbe de valeurs de Σ n'est plus horizontale.

En résumé, en présence de glucose, les levures peuvent s'accoutumer au galactose, ce corps favorisant même l'acclimation pour quelques levures. J'ai de même étudié l'influence du

lévulose substitué au glucose et constaté qu'il empêchait ou retardait beaucoup l'accoutumance des levures au galactose.

Avec les levures de lactose, qui grâce à leur lactose transforment en un mélange de glucose-galactose les mélanges de glucose-lactose dans lesquels on les ensemence, l'accoutumance au galactose est très rapide dans le mélange glucose-lactose, plus rapide qu'en présence d'un mélange de glucose et galactose. La présence du glucose semble être indifférente dans ce cas.

Enfin, ce qui ressort de ce chapitre, c'est la confirmation de ce que nous avons appelé le *principe de Dumas*, et même sa généralisation dans le cas de deux sucres fermentescibles.

VII

INFLUENCE DE L'ACCLIMATATION SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES CELLULES

Le phénomène d'accoutumance nous apparaît déjà assez complexe. En étudiant l'action du toluène sur ce phénomène, nous nous sommes rendu compte que les cellules acclimatées s'étaient modifiées de façon à devenir moins sensibles à l'action de cet antiseptique. Pénétrons un peu plus dans l'étude des changements cellulaires qui se produisent sous l'influence de l'accoutumance, que nous allons voir être très importants.

Au chapitre IV, nous avons vu qu'une levure cultivée dans un milieu riche en peptone et mise ensuite à macérer dans l'eau additionnée de toluène perdait sa zymase. Examinée au microscope, une telle levure possède un protoplasma granuleux, indice d'un vieillissement assez accentué. Le temps que met la zymase à disparaître n'est pas le même si on opère avec une levure accoutumée ou non au galactose. Avec les premières, il faut les laisser macérer pendant 15 jours, pour quelques-unes trois semaines, en présence du toluène, tandis que, pour les secondes, au bout de 4 jours le résultat cherché est obtenu. Supposons que nous disposions de levures accoutumées ou non au galactose, mais dont la zymase a été détruite. Portons-en une trace de chacune dans l'eau de touraillons galactosée, voici ce qu'on constate :

La levure acclimatée, malgré son vieillissement certain, se rajeunit très bien; la levure non acclimatée ne peut, dans ces conditions, se développer. Comme nous l'avons déjà vu, l'addition, au milieu de culture, d'une petite quantité de glucose redonne à la levure sa vitalité en même temps qu'elle favorise son accoutumance au galactose.

Voici donc une levure qui, par suite de son acclimatation, possède la faculté qu'elle n'avait pas avant de se rajeunir dans un milieu nutritif galactosé.

Les levures inactives que nous avions acclimatées en partie au galactose, en nous servant de la méthode indiquée par M. Dubourg, ensemencées dans l'eau de touraillons galactosée, se développent très peu. Elles sont dans le même cas que des cellules vieilles actives, mais non acclimatées.

Ces constatations suffisent déjà pour nous montrer les changements profonds qu'une acclimatation à un sucre peut produire. Une nouvelle preuve résulte encore des changements survenus dans la sécrétion des diastases.

M. Duclaux a montré depuis longtemps l'influence du lait et de l'amidon sur la sécrétion de la caséase et de l'amylase chez le *Penicillium glaucum*.

Chez les levures, un tel exemple n'a jamais été fourni. Les levures, comme toutes les cellules, sécrètent un grand nombre de diastases qui ne sont pas toutes connues. On connaît encore mal les diastases protéolytiques qui doivent ramener la matière albuminoïde à l'état d'ammoniaque, comme l'amylase qui ramène l'amidon à l'état de glucose; mais on connaît assez bien les autres diastases, telles que la sucrase, la lactase, la mélibiase, la maltase, même l'amylase, qui s'attaquent aux substances hydrocarbonées.

Si on fait agir une levure de bière, par exemple, acclimatée ou non au galactose, *mise en masse* dans un tube, sur une solution de saccharose ou de maltose, l'expérience démontre que l'activité de ces deux diastases est indépendante de l'origine de la levure. Ce qu'on exprime en disant que la sécrétion de ces deux

4. On remarquera que le terme d'amylase que j'emploie n'est pas correct, car pour ramener l'amidon à l'état de glucose, il faut trois diastases superposées: l'amylase proprement dite, la dextrinase et la maltase. Le terme amylose employé ici l'est dans un sens général.

diastases est la même chez les levures acclimatées que chez les levures non acclimatées.

La sucrase est une diastase qui dialyse très bien ; nous avons répété l'expérience précédente en extrayant des levures, accoutumées ou non au galactose, la sucrase qu'elles contenaient : la quantité de sucre interverti était la même, quelle que soit l'origine de la sucrase.

On peut répéter l'expérience précédente plus facilement.

On place une *levure en masse* en présence d'une solution de saccharose et de toluène. La fermentation alcoolique dans ce cas est très lente, l'hydrolyse du saccharose est très rapide. Or les résultats trouvés par cette méthode sont conformes aux précédents.

Lactase. — M. E. Fischer a extrait des grains de képhir ou de la levure de lactose séchée un peu de lactase, diastase qui dédouble le lactose en glucose et en galactose. La lactase qu'il obtenait ainsi était peu active.

Pour extraire la lactase, j'ai employé le procédé dont M. Hill s'est servi pour ses études sur la réversibilité des diastases.

On commence par sécher la levure de lactose à 25° dans le vide en présence de SO_4H_2 . La levure une fois sèche, on la pulvérise et la porte à l'étuve Gay-Lussac dont on élève la température jusqu'à 50° pendant 1 heure ; puis, pendant la seconde heure, on porte à la température de 50 à 100°, qui est maintenue constante pendant 6 heures consécutives.

Pour extraire la lactase de la levure sèche, on en broie un gramme avec 10 c. c. d'eau distillée, au moyen d'un agitateur. Après avoir laissé reposer une heure, on décante le liquide qu'on filtre et qu'on additionne de toluène. On ajoute sur la levure 10 autres c. c. d'eau et on recommence le broyage comme précédemment. Le liquide est décanté et ajouté au précédent. La levure est laissée macérer pendant 24 heures dans un endroit frais en présence de 10 c. c. d'eau additionnée de toluène. Le liquide est filtré après ce temps.

On obtient environ 24 c. c. de liquide renfermant de la lactase. Ce liquide décompose le lactose en glucose et en galactose, sucres qu'on différencie comme nous le verrons.

Chauffé à 100°, il est sans action sur le lactose, la diastase ayant été tuée.

J'ai reconnu qu'on n'extrayait pas complètement la diastase des cellules par ce procédé, et, pour comparer l'activité de la lactase dans les levures accoutumées ou non au galactose, je fais directement agir la levure de lactose séchée et tuée à 100° sur la solution de lactose et en présence de toluène. Le liquide de macération m'a servi pour démontrer que la décomposition du lactose était due à un phénomène diastasique.

Après l'action de la lactase, nous avons trois sucres à différencier : le lactose inattaqué, le glucose et le galactose. La solution est divisée en trois parties égales :

Dans la première, on dose le sucre total restant au moyen de la liqueur de Fehling. On a en bloc le glucose, le galactose et le lactose dissous dans le liquide.

Dans la deuxième partie, qu'on stérilise, on ensemence la levure de bière de Bruxelles par exemple, qui attaquerá le glucose et le galactose et laisserá le lactose. En dosant le sucre restant, nous obtiendrons la quantité de lactose inattaqué.

Enfin, la troisième partie, stérilisée également comme la deuxième, est ensemencée avec une levure inactive comme le *S. Ludwigii* qui attaquerá le glucose et laisserá inattaqués le galactose et le lactose. Un dosage du sucre restant nous fournira le galactose et le lactose dissous dans la solution. On connaît la quantité de lactose, il est facile de déduire par différence le galactose.

Il reste à déterminer le glucose. On retranche de l'analyse du sucre de la première portion la quantité de lactose et de galactose qu'on a trouvée, et ce qui reste représente le glucose.

Avec 10 c. c. d'une solution de lactase préparée comme je l'ai indiqué plus haut, agissant sur 1 graminie de lactose, on obtient l'hydrolyse complète de ce sucre à 25° au bout de 36 heures. Les quantités de glucose et de galactose trouvées sont celles que prévoit la théorie.

En extrayant la lactase de levures ayant plusieurs origines, et en comparant l'activité de chacune d'elles, on obtient les résultats suivants :

N° des tubes.	Origine de la levure.	Lactose hydrolysé en 24 heures.	Concentration.
A	lactose	766 milligrammes	—
B	galactose	650 —	1 ^{er} 307 dans 10 c.c. eau
C	glucose	180 —	—

Dans ce cas, l'activité est respectivement de 4—3,5 et 1 si on prend comme unité l'activité de la diastase du tube *c*.

Les différences sont un peu moins considérables si on fait agir directement la levure séchée sur la solution de lactose en présence de toluène. On trouve comme résultats :

	Origine.	Lactose hydrolysé après 18 heures.
a)	lactose	712 milligrammes.
b)	galactose	690 —
c)	glucose	350 —

L'acclimatation a donc encore comme résultat de favoriser non seulement la fermentation du galactose, mais encore d'augmenter l'activité de la lactase. En prenant encore comme unité d'activité celle du tube *c*, on trouve que dans cette dernière expérience celle-ci est respectivement de 2, 1,9 et 1 pour les tubes *a*, *b* et *c*.

Il est même inutile de sécher et de tuer la levure pour constater ces différences dans l'activité de la lactase. En introduisant sur une *levure en masse*, accoutumée ou non au galactose, une solution de lactose, on obtient une différence dans le commencement de la fermentation. Pour peu qu'on ait laissé la levure vieillir, la fermentation du lactose commence par les levures habituées au galactose au bout d'une demi-heure, et seulement au bout de 24 heures pour celles habituées au glucose.

Tout le monde sait qu'une levure de lactose décompose ce sucre en alcool et en acide carbonique, sans qu'on puisse déceler une trace de glucose ou de galactose dans le liquide extérieur. Or, en faisant agir la levure sèche et traitée suivant la méthode de Hill sur une solution de lactose, on constate dans la liqueur la présence d'une certaine quantité de glucose et de galactose : mais ces deux sucres ne sont pas en quantités égales. On trouve la proportion de 4,12 de glucose et de 3,54 seulement de galactose. La levure semble retenir une partie de ce dernier sucre, et ce doit être la raison pour laquelle on ne peut trouver trace de ce sucre dans le liquide de culture lactosé avant tout traitement de la levure.

Ces expériences ont toutes été faites en prenant de la levure qui s'est développée dans un milieu de culture additionnée de 20/0 de sucre.

En diminuant la concentration du sucre dans le milieu de culture, on constate, dans le cas du glucose, une diminution importante de l'activité de la lactase ainsi que du degré d'accoutumance de ces levures.

C'est une relation possible qui nous apparaît entre l'accoutumance et la sécrétion d'une diastase.

Voici un autre exemple : on prend une levure de lactose qu'on fait développer dans de l'eau de touraillons additionnée soit de 1 0/0 de glucose, soit de 4 0/0 de ce même sucre. La levure ainsi obtenue est *mise en masse*, et reçoit soit 2 c. c. d'une solution de lactose, soit 2 c. c. d'une solution de galactose, le tout additionné de toluène. La fermentation commence vite, mais s'arrête bientôt. On dose la quantité de CO_2 dégagé et on trouve :

				Sucre fermenté %.
Levure cultivée dans E. T. + 1%	glucose, reçoit 2 c.c.	sol. lactose.		0,7
—	— + 1%	— 2 c.c. sol. galactose.		0
—	— + 4%	— 2 c.c. sol. lactose.	3,00	
—	— + 4%	— 2 c.c. sol. galactose.		0,8

Plus il y a de lactase, plus l'accoutumance au galactose est grande.

On peut encore obtenir un résultat semblable au moyen d'une expérience très délicate.

On prend une *levure de lactose en masse* habituée au glucose. On l'additionne moitié d'une solution de glucose à 1 0/0, moitié d'une solution de lactose à 1,5 0/0 et de toluène en excès. Le lendemain, la fermentation est terminée. On ajoute alors une solution de galactose qui fermente plus rapidement qu'avant l'action du lactose. Le point délicat de cette expérience est de bien noter la fin de la fermentation et de ne pas attendre trop longtemps pour ajouter le galactose, car nous avons déjà vu l'action mortelle exercée par l'alcool et le toluène sur les levures.

On peut donner à ce résultat l'explication suivante :

La levure en présence de lactose a décomposé ce sucre en glucose et galactose. Il a dû se produire en même temps une augmentation dans la sécrétion de la lactase qui a provoqué une légère accoutumance au galactose. De là les résultats obtenus.

En se reportant au chapitre précédent, nous avons vu que la

levure de lactose, en présence d'un mélange glucose-lactose et même de lactose seul, s'acclimate beaucoup plus rapidement au galactose qu'en présence du mélange glucose-galactose. Ce résultat s'explique très bien maintenant que nous savons qu'une sécrétion abondante de lactase suffit pour provoquer l'accoutumance de la levure au galactose.

En résumé nous venons de voir que l'accoutumance favorise la sécrétion de la lactase, et inversement que la sécrétion de la lactase diminue la période d'accoutumance des levures au galactose. Voici deux phénomènes qui semblent bien liés l'un à l'autre, ce qui ne doit pas être un pur hasard.

Mélibiase. Le mélibiose est un sucre qu'on obtient en traitant le raffinose (mélitriose) par les acides étendus, ou encore par la sucrase, diastase qui hydrolyse le sucre de canne.

Le dédoublement du mélibiose en glucose et en galactose peut se faire soit en traitant ce sucre par les acides concentrés, soit à la température ordinaire au moyen d'une diastase, la mélibiase. Cette diastase n'attaque pas le lactose : de même, la lactase n'attaque pas le mélibiose.

En étudiant l'influence de l'accoutumance des levures au galactose, nous sommes arrivé aux mêmes résultats au sujet de la sécrétion de la mélibiase qu'au sujet de celle de la lactase.

On prend une levure basse de Frohberg *en masse* dans un tube et habituée à différents sucres. On la laisse vieillir pendant deux jours et on ajoute ensuite 2 c. c. d'une solution de mélibiose pur¹.

Chez les levures habituées à ce sucre ou au galactose, la fermentation commence rapidement. Chez les levures habituées au glucose, elle n'a lieu dans ce cas qu'après 5 à 6 jours.

Avec une levure jeune, on constate encore une différence. faible au commencement de la fermentation, mais plus accentuée si on note le temps que met cette levure à faire disparaître 10 0/0 de sucre par exemple.

Si dans le cours de la fermentation on recherche le galactose dans le liquide, on n'en trouve pas. Je ferai remarquer que le

1. On obtient du mélibiose pur en faisant fermenter du raffinose au moyen d'une levure de bière haute. Dans ce cas le levulose provenant du dédoublement de ce sucre fermente seul et le mélibiose reste pur dans le milieu nutritif.

galactose fermente dans ce cas presque aussi vite que le glucose, et cependant les levures de bière ne sont pas comme les levures de lactose naturellement acclimatées au galactose.

Voici quelques résultats :

Origine.	Le dégagement gazeux commence après	8.08 % de mélibiose ont disparu après
—	—	—
Glucose.	3 heures.	45 heures.
Galactose	1/2 heure.	2 heures.
Mélibiose.	1/2 heure.	2 heures.

Des résultats absolument semblables sont obtenus en employant la levure séchée et tuée d'après la méthode de M. Hill.

L'acclimatation des levures au galactose agit donc sur la mélibiase comme sur la lactase.

Au sujet de l'influence de la sécrétion de la mélibiase sur l'accoutumance, nous pouvons citer l'expérience suivante. On fait agir 100 milligrammes de levure de Frohberg habituée au glucose sur une solution de mélibiose et sur une solution d'un mélange de glucose et de galactose. On constate que :

Solution de sucre introduite.	La fermentation a lieu au bout de
—	—
2 c.c. mélibiose 8,08 %.	15 heures.
1 c.c. glucose à 8,08 + 1 c.c. galactose 8,08.	34 heures.

L'accoutumance a été plus rapide en présence de la solution de mélibiose. En comparant l'action de ce sucre avec ce que nous savons de l'action de la lactase, nous voyons que la sécrétion de la mélibiase favorise l'accoutumance.

En résumé, chez les cellules de levures, l'activité ou encore la sécrétion de la lactase et de la mélibiase sont en rapport avec le degré d'acclimatation des levures au galactose, et réciproquement la sécrétion de la lactase ou de la mélibiase semble provoquer en partie une accoutumance des levures au galactose. C'est le moment de se souvenir que ces deux diastases agissent sur deux sucres capables de donner par hydrolyse du galactose. Cette coïncidence ne doit pas être un pur hasard, et il est probable que du moment que ces deux sucres sont proches parents du galactose, la levure capable de détruire par exemple en même temps le galactose et le lactose le fait par des moyens ayant

entre eux une relation assez étroite : l'existence de l'un est liée en partie avec celle de l'autre.

Malgré son caractère théorique, ce chapitre prévoit une conséquence pratique des résultats trouvés. Le raffinose est un sucre qui se trouve en assez grande quantité dans les mélasses. En se dédoublant il donne du lévulose et du mélibiose. Ce dernier sucre disparaît souvent très lentement. Les mélasses contiennent des substances peu favorables aux levures, et dans ces conditions celles-ci s'acclimatent difficilement au mélibiose.

En introduisant des cellules acclimatées au galactose, c'est-à-dire sécrétant déjà de la mélibiase, on obtiendrait une fermentation rapide du mélibiose, et on pourrait sauver d'une perte certaine une cuve fermentant mal.

VIII

THÉORIE DE LA FERMENTATION DU GALACTOSE. — RELATIONS ENTRE L'ACCOUMANCE DES LEVURES AU GALACTOSE ET CERTAINS PHÉNOMÈNES BIOLOGIQUES

Pour expliquer les faits qui précèdent, on peut faire deux hypothèses : La première, c'est d'admettre que l'accoutumance favorise la sécrétion d'une zymase spéciale au galactose; la deuxième suppose seulement une modification de la zymase existante.

L'existence d'une zymase du galactose explique bien la période d'accoutumance qu'on constate avec les levures non habituées à ce sucre, mais elle explique difficilement pourquoi les levures acclimatées feraient fermenter le glucose et le galactose avec des vitesses en rapport constant. Ces vitesses dépendent de l'activité des deux zymases qui devrait varier avec la levure. Nous avons vu qu'il n'en est rien.

Dans un mélange de deux sucres, (glucose et galactose par exemple), si l'acclimatation développait une zymase spéciale, la fermentation du glucose devrait continuer comme auparavant, et le galactose fermenterait indépendamment de l'autre sucre. Or l'expérience apprend qu'aussitôt que le galactose fermenté, la fermentation du glucose diminue.

Un fait qui plaide encore en faveur de l'hypothèse d'une seule diastase est relatif à l'action du toluène sur une levure

accoutumée ou non au galactose. La zymase de la première étant moins sensible que celle de la seconde, on en déduit qu'une transformation de la zymase a pu se produire, la rendant moins sensible à l'action du toluène.

On peut à cette théorie d'une modification d'une zymase unique objecter l'action de l'alcool sur la fermentation du galactose. Tandis que l'hypothèse de deux zymases expliquerait cette action, il est plus difficile de donner une explication dans le cas d'une seule zymase. On sait fort bien que l'alcool influe sur la zymase alcoolique dans le cas de la fermentation du glucose. Il est permis de croire⁷ que l'alcool peut se comporter différemment vis-à-vis d'une même diastase agissant sur deux corps différents.

Du moment que certains corps, dits antiseptiques, entravent plus ou moins l'action d'une diastase, on peut supposer que la substance sur laquelle la diastase agit a une action, faible peut-être, mais qui peut devenir sensible en présence d'un corps antiseptique tel que l'alcool.

Nous supposerons donc que l'accoutumance a pour but de modifier la zymase alcoolique de façon à la rendre capable d'attaquer le galactose. Bien, entendu ce n'est plus la même diastase qu'avant; du moment qu'elle est modifiée, on peut très bien dire qu'il y a changement de zymase : il suffit seulement de s'entendre sur les termes de zymases différentes. J'entends par ces mots qu'il serait possible, par un procédé inconnu jusqu'ici, de séparer ces deux zymases de façon que l'une n'attaque seulement que le glucose et l'autre seulement le galactose.

L'hypothèse d'une modification dans la nature de la zymase permet, si on admet la théorie de Fischer sur la constitution des diastases, c'est-à-dire une relation entre la constitution de la diastase et le corps sur lequel elle agit, de prévoir la nature des diastases sur lesquelles l'acclimatation pourra exercer une influence. Ce seront les diastases qui agissent sur des corps ayant une certaine relation avec le galactose, comme le lactose ou le mélibiose. Ainsi que l'expérience le vérifie, ce seront les diastases comme la lactase et la mélibiase dont l'activité augmentera chez les levures accoutumées au galactose.

Relations entre l'acclimatation et certains phénomènes biologiques.

— Ce travail qui a trait à l'accoutumance de cellules au galac-

tose n'est guère qu'un cas particulier du problème général de l'accoutumance. L'organisme animal est susceptible de phénomènes d'accoutumance. Les leucocytes qu'il renferme doivent s'accoutumer aux toxines, à certaines substances telles que le sulfure d'arsenic dans les expériences de Besredka, ou encore le sérum sanguin dans les expériences de Bordet.

Or, les leucocytes sécrètent des substances antitoxiques ayant les propriétés des diastases, c'est-à-dire destructibles par la chaleur. Comme pour nos levures, cette accoutumance qui constitue l'immunité est plus ou moins facile suivant l'animal et les substances que le sang renferme. Il est probable, en effet, qu'il existe, comme dans notre cas, des substances se comportant comme l'acide borique, c'est-à-dire empêchant toute accoutumance, tandis que d'autres se comportent comme le sublimé, c'est-à-dire n'empêchent pas l'accoutumance, mais seulement le développement du microbe.

L'antitoxine elle-même acclimate les leucocytes à la toxine, tout en agissant comme antidote de la toxine.

Peut-être existe-t-il encore des toxines ayant entre elles des relations de constitution comme le galactose avec le lactose ou le mélibiose, l'immunité conférée par l'une restant acquise pour les autres.

Enfin, comme je l'ai déjà signalé, la diminution de l'accoutumance concorde bien avec la disparition de l'immunité. L'absence de la toxine fait disparaître l'immunité comme l'absence de galactose fait disparaître l'accoutumance à ce sucre.

En résumé, ce travail favorisera peut-être l'étude du problème général de l'acclimatation, problème plus délicat; car on ignore même la nature de certains corps qui agissent et auxquels la cellule doit s'accoutumer. La constitution des corps peut varier, entraînant avec elle les conditions d'acclimatation de la cellule. Le problème étudié avec le galactose avait cette supériorité que ce sucre possède une composition déterminée et susceptible d'aucune variation.

Voici en peu de mots ce qui résulte de ce travail :

1). Le galactose est bien un sucre fermentescible, comme cela résultait des expériences de MM. Fischer et Thierfelder, et Bau.

2). La fermentation du galactose n'est possible que lorsque la levure s'est acclimatée à ce sucre. La durée de l'acclimatation varie avec les levures. Elle est faible pour les levures de lactose, grâce à la présence d'un peu de lactase qui provoque une légère acclimatation.

3). Chez les levures acclimatées, le glucose fermente environ 1,6 fois plus vite que le galactose.

4). Une levure acclimatée perd peu à peu son acclimatation si on lui offre un autre sucre que du galactose, du lactose ou du mélibiose. Si on favorise la multiplication, la perte de l'acclimatation se produit au bout de quelques heures.

5). L'effet de l'acclimatation est nul sur les propriétés morphologiques des levures.

6). Certaines substances empêchent l'acclimatation sans empêcher la fermentation du glucose (BoO_3 , toluène).

7). L'alcool est plus nuisible à la fermentation du galactose qu'à celle des autres sucres.

8). On peut faire perdre sa zymase à une levure cultivée dans un milieu riche en peptone. Cette levure perd alors toute faculté de s'acclimater au galactose si on ne la rajeunit pas en présence de glucose. Si elle était acclimatée, elle conserve la propriété de se rajeunir directement en présence du galactose.

9). Quand on cultive une levure dans un milieu nutritif additionné de glucose et de galactose par exemple, on constate que les levures peuvent s'acclimater au galactose en présence du glucose. Cette acclimatation est difficile en présence du lévulose.

10). L'acclimatation des levures est accompagnée chez certaines levures d'une sécrétion plus grande de mélibiase ou de lactase ; la réciproque est également vraie.

11). Nous avons admis qu'il n'y a qu'une seule zymase pouvant se transformer pendant l'acclimatation, de façon à permettre la décomposition du galactose. Ce changement dans la constitution de la zymase est accompagné d'un changement dans la constitution du protoplasma.

Le phénomène de l'acclimatation est donc, dans ce cas, une modification profonde de l'état de la cellule provoquée par un hydrate de carbone très voisin du glucose.

Il doit en être de même des toxines agissant sur les leucocytes.

12). Enfin, jusqu'à nouvel ordre, la notion de fermentation par entraînement doit être considérée comme inexistante.

BIBLIOGRAPHIE

PASTEUR. Études sur la fermentation alcoolique. (*Annales de chimie et de physique*, III^e série, N^o 58, page 336.)

FUDAKOWSKI. Vorläufige Mittheilung, betreffend zwei aus dem Milchzucker entstehende Zuckerarten. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft*, VIII, page 599.)

Id. Zur näheren Kenntniss der Galactose. (*Berichte der deutsch. Chemisch. Gesellschaft*, IX, pages 42, 278 et 1602.)

Id. Zur Charakteristik der beiden näheren Milchzucker Abkommlinge. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft*, XI, page 1069.)

von LIPPmann. Ueber die Nichtidentität von Arabinose und Galaktose. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft*, XVII, page 2238.)

KILIANI. Ueber die Identität von Arabinose und Laktose. (*Berichte der deutsch. Chemischen Gesellschaft*, XIII, page 2304.)

KOCH. *Pharmaceut. Zeitung für Russland*. 25-Jahrg. 1886, n^o 47, page 764.

HERZFIELD. Ueber die Gährung der Galaktose. (*Rubenzuckerfabrikation des deutsch. Reiches*, n^o 34, page 1384.)

BOURQUELOT. Sur la fermentation du galactose. (*Comptes rendus*, t. CVI, page 283.)

TOLLENS et STONE. Ueber die Gährung der Galaktose. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft* 1886.)

A. BROWN. Influence of oxygen and Concentration on alkoholic fermentation. (*Journal Chem. Society*, 1892, page 369.)

J. O'SULLIVAN. The Rate of alkoholic Fermentation. (*Journal Society Chem. Ind.*, 1898, pages 47 et 559.)

Id. On the hydrolytic and fermentation Fonctions of yeast. (*Journal of the federated instituts of Brewing*, mars 1899.)

E. LAURENT. Nutrition hydrocarbonée et formation de glycogène chez la levure de bière. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, page 143.)

E. KAYSER et BOULLANGER. Sur le glycogène des levures. (*Annales de brasserie et de distillerie*, 1898, page 73.)

CLAUTRIAU. Études chimiques sur le glycogène des champignons et de la levure. T. III. (*Mémoires couronnés par l'Académie Royale de Belgique*, 1893, page 95.)

E. SALKOWSKI. Ueber fermentative Processe in den Geweben. (*Du Bois Raymond's Archiv.*, 1890, page 554.)

F. HESSENLAND. Ueber die Zusammensetzung des Hefegummis. (*Zeitschr. des Ver. f. die Rubenzucker-industrie des deutsch. Reiches*, Bd. 42, A. 1892, p. 671.)

O'SULLIVAN. Ueber alkoholische Gährung. (*Zeitsch. für das ges. Brauwesen*, page 605.)

E. FISCHER. Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. (*Zeitsch. für physiolog. Chemie*, t. XXVI, page 60.)

A. BAU. Ueber die Vergärbarkeit der Galaktose. (*Zeitschrift für Spiritus-Industrie*, 1896, n° 38, page 303; n° 39, page 312.)

E. FISCHER et H. THIERFELDER. Verhalten der verschiedenen Zucker gegen reine Hefen. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft* 1894, Bd. XXVII, page 2031.)

F. VOIT. Ueber das Verhalten der Galactose beim Diabetiker. (*Zeitschrift für Biologie*, t. XXIX, page 147.)

M. CREMER. Ueber die Umlagerungen der Zuckerarten unter dem Einflusse von Ferment und Zelle. (*Zeitschrift für Biologie*, page 183, t. XXXI.)

Id. Demonstration des Hefeglykogenes in den Zellen und als Präparat. (*Munchener med. Wochenschrift* 1894, n° 26.)

Id. Ueber Hefe und Leberzelle. (*Munchener med. Wochenschrift* 1894, n° 22.)

NEUMANN-WENDER. Die Presshefe des Handels. (*Zeitschrift für Nahrungsmitteluntersuchung*, 1896, n° 9 et n° 12.)

E. BUCHNER et RAPP. Alkoholische Gährung ohne Hefezellen. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellsch.*, t. XXXI, page 1090.)

E. DUBOURG. Fermentation des Saccharides. (*Comptes rendus*, t. CXXVIII, page 440.)

DUMAS. Recherches sur la fermentation alcoolique. (*Annales de chimie et de physique*, 1874, 5^e série, t. III, page 81.)

E. FISCHER. Ueber zwei neue Hexite und die Verbindungen der mehrwertigen Alkohol mit dem Bittermandelöl. (*Berichte d. d. chemischen Gesellsch.*, page 1523, t. XXIV.)

Id. Synthesen in der Zuckergruppe. (*Berichte d. d. chemischen Gesellsch.*, page 3230, t. XXV.)

Dr BESREDKA. Immunité vis-à-vis des composés arsénicaux. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIII, page 49.)

J. BORDET. Mécanisme de l'agglutination. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIII, page 225.)

Id. Agglutination et dissolution des globules rouges par le sérum (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIII, page 273.)

STATISTIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR D'ALGER

Du 1^{er} novembre 1894 au 31 décembre 1898.

Par M. le Dr TROLARD, directeur.

Depuis sa fondation l'Institut antirabique d'Alger a reçu 1,836 mordus, à savoir :

Département d'Alger.....	645
— de Constantine.....	557
— d'Oran.....	632
Tunisie.....	2
TOTAL.....	4,836

En outre, 112 personnes se sont présentées pour suivre le traitement et n'ont pas été admises pour des raisons diverses.

Rangés d'après leur sexe et leur nationalité, ces 1,836 mordus se décomposent de la façon suivante :

		Alger.	Constantine.	Oran.	Tunisie.
Français.....	H.	284	172	248	»
—	F.	96	67	98	»
Espagnols.....	H.	48	18	102	»
—	F.	18	5	31	»
Autres Étrangers....	H.	29	46	12	»
—	F.	17	18	11	»
Israélites indigènes ..	H.	9	3	9	»
—	F.	3	2	4	»
Musulmans indigènes.	H.	112	193	107	2
—	F.	29	33	21	»

Dans ces nombres sont compris 21 officiers et 127 sous-officiers et soldats.

Dans la série libellée « autres étrangers » figurent 92 Italiens, 27 Maltais et 5 divers.

Le nombre total des indigents est de 1,284.

Le classement d'après le siège et la gravité des morsures est le suivant : il est établi sur le modèle des statistiques ordinaires de l'Institut Pasteur, et les mêmes lettres y ont les mêmes significations.

STATISTIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR D'ALGER

STATISTIQUE DU 1^{er} NOVEMBRE 1894 AU 31 DÉCEMBRE 1899

	A	B	C
Morsures à la tête et à la figure. { simples ..	1	36	24
{ multiples ..	6	41	49
Cautérisations efficaces.....		4	1
Cautérisations inefficaces.....	2	21	12
Pas de cautérisation.....	4	55	30
Morsures aux mains. { simples ..	29	221	157
{ multiples ..	18	273	207
Cautérisations efficaces.....	2	22	19
Cautérisations inefficaces.....	22	165	137
Pas de cautérisation.....	23	317	208
Morsures aux membres et au tronc. { multiples ..	8	125	108
{ simples.	46	185	259
Cautérisations efficaces.....		7	23
Cautérisations inefficaces.....	9	123	150
Pas de cautérisation.....	15	180	194
Habits déchirés.....	16	189	201
Morsures à nu	8	121	166
Morsures multiples en divers points du corps.	3	46	45
Cautérisations efficaces.....			3
Cautérisations inefficaces.....	1	48	14
Pas de cautérisation.....	2	28	28
Habits déchirés.....	1	45	25
Morsures à nu	2	31	20
TOTAUX. . . . { Français et Européens.	66	729	544
{ Indigènes.....	14	937	819
	80	208	275
TOTAL GÉNÉRAL.....			1.836

Les animaux mordus ont été :

Chiens, 1669 fois; chats, 130 fois; ânes, 9 fois; chacals, 6 fois; singes, 3 fois; bœufs, 2 fois; chèvres, 2 fois; mullet, cheval, chevreau, mouton et lièvre, chacun une fois. Total : 1,836. Il y a eu en outre 10 traitements préventifs.

Sur ce total il y a eu 9 morts, soit une mortalité de 0,49 0/0.

Ces cas de mort se répartissent de la façon suivante. La première colonne de chaque catégorie donne le nombre des mordus, la seconde le nombre des morts, la troisième la mortalité pour 100.

	Morsures à la tête et à la figure.			Morsures aux mains.			Morsures aux membres et au tronc.			Morsures multiples en différents points du corps.			TOTAUX		
Tableau A.	6	0	0	47	1	2,13	24	0	0	3	1	33,33	80	2	2,5
Tableau B.	77	1	1,30	504	0	0	310	1	0,32	46	0	0	937	2	0,21
Tableau C	43	1	2,32	364	2	0,54	367	0	0	45	2	4,44	819	5	0,61
	126	2	0,16	1,015	3	0,29	701	1	0	94	3	3,44	1,836	9	0,49

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

